下咽頭癌および前癌病変のサイトケラチン 発現性に関する免疫組織化学的研究

京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：村上 泰教授）

村上 泰, 安田 範夫, 斉藤 裕子, 任 書熹, 中井 茂

IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION ON EXPRESSION OF CYTOKERATINS
IN NORMAL EPITHELIUM, PRECANCEROUS LESIONS AND CARCINOMAS OF HYPOPHARYNX

YASUSHI MURAKAMI, M.D., NORIO YASUDA, M.D., YUKO SAITO, M.D.
HUMIKI NIN, M.D. and SHIGERU NAKAI, M.D.

Department of Otolaryngology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto

In order to obtain a more objective method to evaluate epithelial disorders and carcinomas of the hypopharynx, the expression pattern of cytokeratins (CKs) was investigated by ABC technique using several kinds of monoclonal antibodies that react monospecifically with each subclass of CKs.

In normal epithelia, CK-19 was strongly positive in the basal layer but apparently reduced in suprabasal layers and completely negative in superficial layers, while CK-13 showed a striking contrast to CK-19, being expressed within the whole thickness of epithelia except only in the basal layer.

These 2 subclasses were also observed in "abnormal" epithelia, and characteristic changes of their combination were demonstrated in proportion to the histological gradings.

In invasive carcinomas, CK-19 was strongly positive in all carcinoma cells of poorly differentiated carcinomas. It was sporadically positive in moderately differentiated carcinomas, the more differentiated the more sporadic. It was completely negative in well differentiated carcinomas. CK-13, on the other hand, was negative in poorly differentiated carcinomas but positive in keratinized cells of moderately or well differentiated carcinomas. Strong expression of CK-1 was observed only in well keratinized cells of hyperkeratotic epithelia and well differentiated carcinomas.

These characteristic findings are consistently observed in all samples and, then, may be useful in evaluating epithelial disorders and carcinomas of the hypopharynx, when used in conjunction with standard histological techniques. It seems most likely that these results play a part in investigating normal and abnormal processes of cell differentiation.

Key words: 下咽頭癌, 上皮の分化と癌化, 癌の分化度
サイトケラチン, 免疫組織化学, モノクローナル抗体

A94-0183-53341

1. 結 言

下咽頭癌の治療成績はきわめて不良で, 早期発見が望まれるのであるが, 自覚症状が乏しい故になかなか

困難である。そこで, スクリーニング用のフード付き下咽頭ファイバースコープが開発され¹⁾, 外来診療中には行い得なかった下咽頭腔の精査が簡単な塗布麻酔

だけでやれるようになったことは大いなる進歩である。これによって疑わしい病変を認めれば、全身麻酔下の硬性鏡検査により生検組織を採取して病理組織学的に精査することになる。ところが、病理組織所見を的確に判定することは必ずしも簡単なことではない。特に、前癌病変と癌の鑑別および癌の分化度の判定については、パラフィン切片標本の HE 染色による形態的評価法^{2)~4)}としてすでに確立されているものの、検者の主観によるところも確かに多い。優れた病理医の判定は一致することが多いのは事実だが、必ずしも客観的評価法とは言い難い。病理組織診断において HE 染色標本の詳細な観察が基本であることは言うまでもないが、さらに何らかのより客観的な診断法の開発が望まれる。

正常上皮から前癌病変と言われる異型上皮への移行、さらに癌化が起こる際に、層状配列の乱れ、極性の乱れ、dyskaryosis および核異型を生じるが、これらの形態的変化の他に、肉眼ではもちろんのこと顕微鏡下の観察でも捉えることのできない何らかの化学的变化が生じていると考えられ、視点を変えて色々な側面からそれらを捉えようとする試みがなされてきた。

その一つとして、粘膜上皮細胞の主たる構成蛋白成分であるサイトケラチン(Cytokeratin, 以下 CK と略す)の発現性に变化が起こることが知られている^{5)~10)}。そこで、その変化を捉えて診断の一助にしようとする研究が喉頭や食道についてなされてきた^{8)9)12)~14)}。

CK にはそれぞれ分子量の異なる19種のサブクラスが知られており⁵⁾、そのどれが、どこに、どのようなかたちで発現し、病的状況でそれらがどう変化するのかを捉えて診断に役立てようとするものである。

そこで各サブクラスに対応する10種類の monospecific な抗 CK モノクローナル抗体を用いて下咽頭正常上皮、上皮内癌を含む病的上皮、および分化度の異なる浸潤癌の三者について CK 発現性を調べ、HE 染色標本と対比させてそれぞれの特徴を知ることによって、より客観的な病理組織診断法を確立しようとした。

2. 研究方法

1) 対象

下咽頭鏡検査で粘膜異常を認めた37症例から生検組織を得た。それらはわずかな表面不整、びらん、色調異常、白色小さいば状病変、粘膜硬化、明らかな癌とそ

表 1 免疫組織染色に用いた ABC 迅速法

1. 脱パラフィン, 脱アルコール
2. 内因性ペルオキシダーゼ阻止 (3% H₂O₂, 5 分間)
3. 抗原性 unmasking (0.25%トリプシン, 2 分間)
4. 非特異染色ブロック (正常馬血清, 10分間)
5. 一次抗体反応 (各抗 CK 抗体, 10分間)
6. ビオチン化二次抗体反応 (10分間)
7. ABC 試薬反応 (10分間)
8. DAB 発色 (3 分間)
9. 対比核染色 (ヘマトキシリン30秒)
10. 脱水, 封入

の周辺粘膜などを含んでいる。これらとは別に、下咽頭に病変のない16症例から、事前承諾を得たうえで剖検あるいは手術時に小組織片を採取して正常下咽頭粘膜とした。

2) 組織切片作成

これらの組織片を直ちに85%エタノールで48時間固定し、パラフィン包埋して、粘膜面に直角に切り出し、4μm 厚の組織切片を15枚連続して作成し、その内の1枚を HE 染色して比較検討用とした。

3) 免疫組織染色

残りの組織切片には、ABC 法¹⁵⁾により免疫組織染色を行った。脱パラフィン脱アルコールの後、3%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼを阻止し、トリプシン処理して抗原 (CK epitope) の unmasking を行った後に、以下に示す各種のマウス抗 CK 抗体を一次抗体として Vectastain Elite ABC Kit を用いて反応させた。陽性反応は DAB にて褐色に発色させ、ヘマトキシリンで対比核染色を施した。その概要を表 1 に示す。

4) 抗 CK 抗体

市販されていて入手可能な10種類の monospecific マウス抗 CK モノクローナル抗体を各サブクラスに対応させて使用した。それぞれについて各種組織を用いて予備実験を行い最適希釈度および染色に際しての陽性コントロールを決めておいた。それらは CK-1 に対して Enzo MA-904 (2000倍希釈), CK-3 に対して Progen AE-5 (100倍希釈), CK-7 に対して Amersham RPN-1162 (100倍希釈), CK-8 に対して Enzo MA-902 (2000倍希釈), CK-10 に対して sanbio RKSE-60 (10倍希釈), CK-11 に対して BioMakor CK-8.60 (200倍希釈), CK-13 に対して Progen Ks-13.1 (200倍希釈), CK-14 に対して BioMakor CKB-1 (500倍

村上論文付図(1)

図 1

図 2

図 3

図 4

図 5

図 6

村上論文付図(2)

図7

図8

図9

図10

村上論文付図(3)

図11

図12

図13

図14

図15

図16

村上論文付図(4)

図17

図18

図19

図20

表2 HE染色標本による組織分類
(n=53)

正常上皮	22
単純肥厚上皮	6
{ acanthosis	4
{ hyperkeratosis	2
異型上皮	10
{ 軽度異型	4
{ 中等度異型	3
{ 高度異型	3
上皮内癌	5
浸潤(扁平上皮)癌	10
{ 低分化癌	2
{ 中等度分化癌	4
{ 高分化癌	4

希釈), CK-18 に対して Progen Ks-18.18 (200倍希釈), CK-19 に対して Progen Ks-19.1 (200倍希釈)である。さらに国外研究施設 (Dr. Elaine V. Fuchs) からの好意で入手し得た抗 CK-6 抗体も使用した。

5) 染色標本の比較検討

HE 染色標本は従来一般になされている形態学的病理組織分類に従って, 正常上皮, 角化(hyperkeratosis)を含む単純肥厚 (simple hyperplasia), 異型上皮 (dysplasia), 上皮内癌, 浸潤癌の5群に分類した。さらに異型上皮は層状配列の乱れ, 極性の乱れ, dyskaryosis および核異型の程度によって軽度, 中等度, 高度の3亜型に分類した。また浸潤癌(すべて扁平上皮癌)については核異型, 細胞角化の程度, 癌真珠形成傾向, 癌巣形成傾向によって低分化癌, 中等度分化癌, 高分化癌の3亜型に分類した。

免疫組織染色は発色剤として用いた DAB による細胞質染色性の程度を発現性の強さとした。すなわち著しく褐色に染まるものを高度陽性(卅), うすく染まるものを中等度陽性(卅), わずかに染まるものを軽度陽性(+), 染まらないものを陰性(-)とした。また, すべての細胞が陽性の場合を均一 homogenous (○), 陽性の細胞と陰性の細胞とが混在し, 全体としてまだらに染色される場合を不均一 heterogenous (△)と表現した。

3. 結 果

1) HE 染色標本による組織分類

得られた53検体を HE 染色標本によって分類した

表3 正常上皮における CK 発現性 (n=22)

	CK-19	CK-13	その他の CK
上層細胞群	—	卅, ○	—
棘細胞群	+, ○	卅, ○	—
傍基底細胞群	+, ○	卅, ○	—
基底細胞群	卅, ○	—	—

表4 単純肥厚上皮における CK 発現性 (n=6)

	acanthosis (n=4)		hyperkeratosis (n=2)		
	CK-19	CK-13	CK-19	CK-13	CK-1
上層	+, ○	卅, ○	—	卅, ○	卅, △
中層	+, ○	卅, ○	+, ○	卅, ○	卅, △
深層	+, ○	卅, ○	+, ○	卅, ○	—
基底層	卅, ○	—	卅, ○	—	—

* その他の CK はすべて (—)

結果は表2のように, 正常上皮22例, 単純肥厚6例, 軽度異型上皮4例, 中等度異型上皮3例, 高度異型上皮3例, 上皮内癌5例, 低分化癌2例, 中等度分化癌4例, 高分化癌4例であった。なお, 単純肥厚の4例は棘細胞増殖の著明な acanthosis で, 他の2例は角化の目立つ hyperkeratosis であった。上皮内癌5例の内の2例は梨状陥凹癌切除時に採取した肉眼的には正常な隣接粘膜から発見されたものである。また, これらの上皮内癌はすべて非角化癌細胞から成っていた。

2) 免疫組織染色

(1) 正常上皮

正常上皮22検体のすべてにおいて, わずか2種類の CK サブクラスにのみ陽性反応が認められた, CK-19 および CK-13 であり, 他のサブクラスについてはすべて陰性であった。これら2種の発現性は, 上皮を構成する細胞層別にみて, 全く逆の関係が認められた。

CK-19 は基底細胞層では強陽性に発現し著しく褐色に染色されたが, 傍基底細胞層では極端に低下してわずかに染色され, 棘細胞層で表層へ向かうに従ってますます低下して, 表層では全く陰性であった(図1)。

これに対して CK-13 は全く逆の発現パターンを示し, 基底細胞層のみ陰性で, それ以外の全層で陽性であり, 表層へ向かうほど強陽性であった(図2)。これらの結果は検索した22検体に共通しており, まとめて表3に示す。

(2) 単純肥厚上皮

やはり CK-19 と CK-13 の発現性が認められた。acanthosis の4例では CK-19 は基底細胞層に強陽性

であったが、それより表層でも全層に陽性であった。CK-13の発現性は正常上皮と全く同様であった。これに対して hyperkeratosis の2例では、これらの所見に加えて角化した細胞群に CK-1 の強い発現性が認められた(図3)。それ以外の CK はすべて陰性であった。その結果をまとめて表4に示す。

(3) 異型上皮

軽度異型上皮は基底細胞類似細胞群が深層1/3程度を占めるもので、この所見と一致する発現性が認められた。すなわち CK-19 はそれらの細胞群でのみ強陽性で、それより表層では陰性であったのに対して、CK-13 は全く逆の関係を示した。

中等度異型上皮ではさらに深層1/2以上を基底細胞類似細胞が占めており、それと一致して CK-19 が強く発現し、CK-13 は表層1/2でのみ陽性であった。異型の程度に応じて CK-19 陽性細胞の占める範囲が広く、逆に CK-13 陽性細胞の占める範囲が狭かった(図4, 5)。

高度異型上皮はほぼ全層で配列が乱れ、dyskaryosis が目立つ基底細胞類似細胞がほぼ全層を占めるが、極性は特に深層でわずかに保たれており、核分裂像も比較的少ない。CK-19 はほぼ全層で強く発現するのに対して、CK-13 の発現性は不均一にほんのわずかに認められた(図6, 7)。それ以外の CK の発現は全く認められなかった。これらの結果をまとめて表5に示す。

(4) 上皮内癌

高度異型上皮とよく類似するが、分化らしきものは認められないから、層状配列が見られずすべての細胞が基底細胞に類似している。極性も全く乱れ、核異型はさらに高度で、多くの核分裂像を認める。CK-19 は全層で著しく強く発現するが、CK-13 は全く陰性であった(図8, 9)ものが2例、きわめてわずかに認められたものが3例であった。これらの特徴的所見は micro-invasive carcinoma と軽度異型を伴う単純肥厚上皮とが連続して見られる標本(図10, 11)でもは

っきり認められた。それ以外の CK の発現性は全く認められなかった。これらの結果を表6に示す。

(5) 浸潤型扁平上皮癌

低分化癌では2例とも、CK-19 が均一性に強陽性であったのに対して、CK-13 は全く陰性であった(図12, 13, 14)。

中等度分化癌では全例で、低分化癌と異なって CK-13 の発現性も認められた。CK-19 および CK-13 の発現性はいずれも不均一でまだらなのが特徴的であったが、分化の程度に応じて差があり、より低分化に近い形態を示すものでは、CK-19 がほぼ均一性に強陽性で、CK-13 の発現性が弱いのにに対して、角化傾向のある細胞群の多い高分化癌に近い形態のものでは、CK-19 の発現性は不均一まだらで、むしろ CK-13 のほうが強く発現した(図15, 16, 17)。

癌真珠を伴う高分化癌では全例で、CK-19 は全く陰性で、低分化癌および中等度分化癌とは著しく対照的であった。CK-13 の発現性もさほど強くはなく、不均一に、主として角化傾向のある細胞群では陽性であった。低分化癌および中等度分化癌ではこれら以外の CK の発現性は全く認められなかった(中等度分化癌で、CK-1 陽性細胞がほんのわずかに散見されるものがあつた)のに対して、高分化癌では、特に角化傾向の強い細胞群や癌真珠で CK-1 の強い発現性が見られた。ただし、癌真珠の中心部は染色されなかった(図18, 19, 20)。これらの結果をまとめて表7に示す。

表6 上皮内癌における CK 発現性 (n=5)

	CK-19	CK-13
上 層	卅, ○	+-, △
中 層	卅, ○	—
深 層	卅, ○	—
基底層	卅, ○	—

* その他の CK はすべて (—)

表5 異型上皮における CK 発現性 (n=10)

	軽度異型 (n=4)		中等度異型 (n=3)		高度異型 (n=3)	
	CK-19	CK-13	CK-19	CK-13	CK-19	CK-13
上 層	—	卅, ○	—	卅, ○	卅, ○	+, △
中 層	+, ○	+, ○	卅, ○	+, △	卅, ○	+, △
深 層	卅, ○	—	卅, ○	—	卅, ○	—
基底層	卅, ○	—	卅, ○	—	卅, ○	—

* その他の CK はすべて (—)

表7 浸潤癌における CK 発現性 (n=10)

	CK-19	CK-13	CK-1
高分化癌	—	卅, △	卅, △
中等度分化癌	卅, △	卅, △	—
低分化癌	卅, ○	—	—

* その他の CK はすべて (—)

4. 考 按

1) CK とその発現性について

上皮細胞質の細胞骨格をなす線維性構成蛋白であるCKは直径約10nmの中間径フィラメントのひとつで、ヒトでは分子量の異なる19種のサブクラスが知られ、acidic type と basic type とがあって、それらが対をなして keratin pair として存在することが知られている¹⁵⁾¹⁶⁾。ヒトの正常上皮については部位により存在するサブクラスが異なることが知られ、頭頸部領域でも食道、喉頭、口腔など多くの部位について報告^{9)~14)17)~20)}があるが、下咽頭上皮や下咽頭癌については全く知られていない。癌細胞のCKを検索するに際しては、その発生母地となった上皮細胞のCKを受け継ぐものとされているから、まず第一に正常上皮でのそれを確定しておかねばならない。

CKの存在はポリクローナル抗体によってCKそのものを染色することができるが、サブクラスを正確に捉えようとするならば、それぞれのサブクラスに特有な単一の抗原決定基 (antigenic determinant = epitope) だけを認識する monospecific なモノクローナル抗体を用いて、その免疫反応性を証明するという方法によることになる。そこで、固定包埋による抗原決定基の変質や masking の可能性、unmasking 処理の適否、抗体の specificity, affinity や avidity の良否など、免疫組織染色上の技術的問題^{21)~25)}に十分注意せねばならない。幸い最近になってきわめて良質の抗CK抗体が得られるようになり、鋭敏で特異性の高い免疫反応の検索にきわめて有効なABC法も開発され、エタノール固定、パラフィン包埋組織切片を用いて容易に免疫反応性をみることができるようになったが、まだすべてのサブクラスについての抗体が入手可能なわけではない。したがってここで行われた研究も、現在市販されて入手可能な10種の抗体を用いたもので、すべてのサブクラスを網羅するものではないことを再確認しておかねばならない。

CKを捉えるもう一つの方法として組織からの抽出蛋白電気泳動による免疫化学的な方法がある。クロマトグラフィーで分子量を割出してどのサブクラスに当たるかを見る方法であるから、含まれるすべてのサブクラスを知ることができ、ある程度量的な検討も可能である。しかし、HE染色標本と対比させて、画像として結果を分析できないのが決定的な短所である。例えば癌組織からの抽出蛋白といっても、血液などの混入もあり得るし、非癌細胞や血管壁などを構成する蛋白

の混入は避けられない。従ってその結果は必ずしも癌細胞特有のものとは言い切れない。いわんや個々の癌細胞についての発現性の比較などは到底不可能である。そこで、現状ではまだすべてのサブクラスについて検索することはできないにせよ、抗体の得られるサブクラスに関しては、それがどこに、どの程度発現し、病的変化に応じてどう変化するものかを検索するうえで免疫組織化学的方法がはるかに優れ、結果についても信憑性があるといえることができる。

いくつかのサブクラスに対応する polyspecific なモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的研究の報告は多いが、monospecific でないために特定のサブクラスについて検討することができないことに最大の難点があった。例えば、CAM-5.2 (Becton Dickinson, CK-14, 18, 19に対応するとされている) は反応性のよい抗CK抗体として上皮性腫瘍であるか否かの診断には多く用いられてきたが、これで異型喉頭上皮や喉頭癌を染色¹²⁾¹³⁾すると、異型性のつよい細胞群で陽性になるという傾向がみられるが、これら3つのサブクラスのどれか一つが反応しても結果は同じように陽性となるから、病変の程度や癌の分化度に応じた特異性に乏しいのはむしろ当然で、どれが、どこに、どの程度発現するのか分析できないかぎり、詳細な検索には役立たないことになってしまう。個々のサブクラスに対応する monospecific な抗体を用いることの必要性はここにある。

2) 結果についての考察

——粘膜上皮の分化、癌化および癌の

分化との関連性についての一考察——

下咽頭上皮の形態的变化に対応してCK発現性に著明な相違が認められたことは大変興味深く、当初目的とした診断学的意義が大きいと考えられるが、さらに、粘膜上皮の分化、癌化および癌の分化と何らかの関わりがあるように思われるので、その因果関係については確答し得ないまでも、結果から推測し得る範囲で考察しておく。

粘膜上皮の分化については、基底細胞群が増殖しつつ傍基底細胞、棘細胞群へと分化し、さらに棘細胞群が外層の細胞群へと分化していくものとされている。正常上皮で、BrdUを用いてS期細胞を免疫組織学的に染色することにより増殖動態を検索した結果²⁶⁾²⁷⁾では、基底細胞群では明らかな増殖が認められ、棘細胞群でもわずかに認められるのに対して、外層の細胞群では全く認められないことからみて、この分化の方

向は正しいと考えられる。従って、基底細胞層に発現するCKが正常上皮の最も基本的なCKであると考えてよい。

基底細胞層についての我々の結果では全検体でCK-19だけが認められ、他のサブクラスは全く認められなかった。下咽頭上皮に関する報告は全くないが、食道上皮ではやはりCK-19が基底細胞層に認められbasal CKであるとする報告^{28)~30)}があり、同じ食道系で同一の結果であった。ところがこの著しい発現性は傍基底細胞層では激減し、棘細胞層では層毎にさらに減少していき、表層では全く認められなくなる。この結果は、正常に分化増殖する下咽頭上皮では基底細胞から傍基底細胞へと分化する過程、さらに傍基底細胞が増殖する過程でCK-19に対応するepitopeが失われていくことを示唆している。一方、基底細胞層で全く認められなかったCK-13が傍基底細胞層では明らかに発現し、表層へ向かって層を追う毎に強く発現するようになる結果は、基底細胞にはない新しいepitopeが分化の過程で出現することを示唆している。如何なる理由で、如何なる機序でそうなるのかは不明で、形態的变化に伴ってこれらの発現パターンが変化したものなのか、あるいは発現パターンの変化が原因して形態的变化を引き起こしたものなのかは不明であるが、分化の過程で蛋白合成にはつきりと変化が起こることを示している。

CK-19は最も小さい分子量40kDのacidic CKで、CK-5とkeratin-pairをなして非角化扁平上皮に発現するとされており³¹⁾、また、CK-13は分子量54kDのacidic CKで、CK-4とのkeratin pairでsuprabasal layersに発現し、stratification associated CKであると考えられている⁷⁾から、下咽頭上皮でもCK-19が基底細胞層に、CK-13がそれ以外の層に認められたことは想像したとおりであり、重層扁平上皮として層状配列をすることにCK-13が何らかの役割をはたしているのかもしれない。

正常上皮でみられたこれらの結果をもとにして異常上皮におけるCK発現パターンの変化を考察すると、形態的異常を分化の遅れや乱れとして捉えることができる。単純肥厚ではほぼ正常上皮と同様のパターンであったが、CK-19が弱いながら全層で発現する結果からみて、棘細胞群の分化の遅れた異常増殖と考えられる。喉頭と異なって下咽頭では上皮の角化はほとんどないが、hyperkeratosisのみられた検体でCK-1の発現性を認めたことは興味深い。CK-1は分子量の最も

大きい68kDのbasic CKで、keratinization associated CKとして表皮に発現するものとされている⁹⁾。従ってこの結果は正常上皮での分化過程の単なる時間的異常を示すものではなく、異常な分化過程が新たに生じたことを強く示唆するものである。

異型上皮でみられたCK-19およびCK-13の発現パターンの変化は基底細胞群の分化の遅れとして捉えることができる。基底細胞が傍基底細胞さらに棘細胞へと分化しきれずにCK-19のepitopeを持ったまま、形態的にも類似性のある細胞群が増殖し、どちらが原因結果であるかは不明であるが、おそらくはstratification associated CKとしてのCK-13が発現しないために層状配列が乱れていったものと考えられる。そして、これらの化学的異常の程度に比例して形態的異型性の程度差を生じるものと考えられる。何らかの原因で癌化が起ると、単なる分化の乱れに留まらず、増殖の不規則な異常促進を生じるものと考えられるから、hyperproliferation associated CK⁶⁾とされているCK-6、16が関与するのではないかと思われるが、市販抗体はなく、USAから直送してもらった抗CK-6抗体も変性のために残念ながら検索し得なかった。

声帯白色病変では高度異型上皮と上皮内癌との鑑別が常に問題となり、より客観的な評価法の開発が望まれてきた。下咽頭では上皮内癌が見つかることはきわめてまれであるが、適切な下咽頭鏡検査が行えるようになった今日では、早期病変を発見し得る可能性があり、同様な問題が起こり得ると思われる。残念ながら、我々の結果では両者をはっきり鑑別することは難しい。連続する両者を見比べればCK-19の発現の程度に差があり、上皮内癌でより強い発現性が認められることが分かるが、単一検体でその程度を判断することは難しい。上皮内癌でCK-13を全く認めないものがあったが、わずかながら認めたものもあるから、CK-13が全く発現しない場合にのみ上皮内癌の確定診断が可能である。そこでこれらの所見を参考にして、形態的に配列や極性の乱れの程度、核異型の程度、分裂像の多寡などから総合的に判定すべきであろう。

喉頭では角化型の上皮内癌もあるとされているが、我々の検索し得た下咽頭の上皮内癌5検体はすべて非角化型で基底細胞類似の細胞群から成るものばかりであったから、下咽頭癌は基本的に低分化の非角化型の癌として発症するものと考えられる。しかし臨床上、個々の下咽頭浸潤癌にはいろいろな分化度のものがあ

り、biological behavior にも差があることが知られているから、癌化してからでも分化してゆくことが示唆される。おそらく、浸潤癌として異常な増殖を開始する際に、何らかの大きな変革が起こり、その時点での分化の程度差によって形態的表現型に差が現れ、臨床的にみられるいろいろな分化度の癌を生じるものと推定される。

低分化癌ではCK-19は強陽性で、CK-13およびCK-1は全く陰性である。これは上皮内癌における発現パターンと酷似しており、上皮内癌からほとんど分化することなく浸潤増殖していったことを示唆している。一方、中等度分化癌ではCK-19およびCK-13いずれも陽性で、より低分化な形態を示すものほどCK-19陽性細胞が多くCK-13陽性細胞が乏しい傾向が認められ、逆に、角化傾向の強い細胞群でCK-13の発現性が強く、CK-1陽性細胞が散見されるところがときに認められた。これらの結果は癌細胞群に正常上皮での分化とは異なる分化過程による不規則な分化が生じたことを意味し、CK-13の発現による層形成傾向が胞巣形成傾向となって現れるものと推測される。高分化癌ではCK-19の発現性は完全に失われる一方、よく分化して細胞間橋の明瞭な細胞群では、CK-13よりもむしろCK-1がよりつよく陽性になる。この結果は癌としての異常な分化過程が進行して、正常上皮ではみられない異常な蛋白合成が行われていることを示唆するものであり、異常な形態的表現として癌真珠が形成されていくものと考えられる。ただし、癌真珠の中心部ではいずれのCK発現性も認められず、すでに変性して細胞としての性格が失われているものと推測された。

これらの結果は下咽頭上皮異型および下咽頭癌分化度の客観的評価に役立つと同時に、形態的变化では捉えられない細胞質の化学的变化をよく現現していて、正常上皮の分化、上皮異型の進行および癌化、さらに癌の分化度を考察する上での一つの資料を提供するものと考えられる。

5. まとめと結論

下咽頭の正常上皮、単純肥厚上皮、異型上皮、上皮内癌および分化度の異なる浸潤癌のサイトケラチン発現性について、10種類のモノスペシフィック抗サイトケラチンモノクローナル抗体を用いて、ABC法によって免疫組織学的に検索し以下のごとく結論した。

1. 正常上皮ではCK-19およびCK-13だけが認められた。CK-19は基底細胞層でつよく発現し、su-

prabasal layersでは著しく減弱するのに対して、CK-13は全く逆のパターンを示し、基底細胞層のみ陰性であった。

2. 単純肥厚上皮では正常上皮とほぼ同様の発現パターンであったが、hyperkeratosisでCK-1が陽性であった。

3. 異型上皮でもCK-19とCK-13だけが認められたが、異型性の強いものほどCK-19が表層近くまで認められ、逆に、CK-13が表層近くまで陰性であった。

4. 上皮内癌ではCK-19が全層で強い発現性を示したのに対して、CK-13は全く陰性か、不均一にわずかに認められた。他のCKは全く陰性であった。

5. 低分化癌ではCK-19が均一に強陽性であったのに対して、CK-13、CK-1は全く陰性であった。

6. 中等度分化癌ではCK-19強陽性であったが不均一で、より低分化な形態を示すものほどより均一であった。CK-13も陽性であったが不均一で、より高分化な形態を示すもので強く発現した。ごく一部の角化した細胞でCK-1陽性のものが散見された。

7. 高分化癌ではCK-19は全く陰性であった。CK-13の発現性も強くはなく、不均一に主として角化した細胞群で陽性であった。CK-1は角化した細胞や癌真珠で強陽性であったが、癌真珠の中心部はすべて陰性であった。

8. これらの結果は、上皮の分化、上皮異型の進行および癌化、さらに癌の分化度を考察するための資料になり得ると考えられた。

参考文献

- 1) 磯貝 豊: 下咽頭 fiberoptic. *JOHNS* 4: 1655-1662, 1988.
- 2) Hellquist H, Olofsson J, Grontoft O et al: Carcinoma in situ and severe dysplasia of the vocal cords. A clinicopathological and photometric study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 92: 543-555, 1981.
- 3) Grundmann E: Classification and clinical consequences of precancerous lesions in the digestive and respiratory tracts. *Acta Pathol Jpn* 33: 195-217, 1983.
- 4) Kleinsasser O: Precancerous lesions of the larynx. Georg Thieme Verlag, New York, 1988.
- 5) Moll R, Franke WW, Schiller DL et al: The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*

- 31: 11-24, 1982.
- 6) Stoler A, Kopan R, Duvic M et al: Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal differentiation. *J Cell Biol* 107: 427-446, 1988.
 - 7) Moll R, Achtstaetter T, Becht E et al: Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. *Amer J Pathol* 133: 123-144, 1988.
 - 8) Banks-Schlegel SP, Harris CC: Aberrant expression of keratin proteins and cross-linked envelopes in human esophageal carcinomas. *Cancer Research* 44: 1153-1157, 1984.
 - 9) Grace MP, Kim KH, True LD: Keratin expression in normal esophageal epithelium and squamous cell carcinomas of the esophagus. *Cancer Research* 45: 841-846, 1985.
 - 10) Bobrow LG, Makin CA, Law S: Expression of low molecular weight cytokeratin proteins in cervical neoplasia. *J Pathol* 148: 135-140, 1986.
 - 11) Van Muijen GNP, Ruiter DG, Franke WW: Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins 4 and 13. *Exp Cell Res* 162: 97-113, 1986.
 - 12) Terry RM, Gray C, Jackson P et al: Expression of low molecular weight cytokeratins in the neoplastic vocal cord. *J Laryngol Otol* 100: 1279-1282, 1986.
 - 13) Hellquist HB & Olofsson J: Expression of low molecular weight cytokeratin proteins in laryngeal dysplasia. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 96: 971-978, 1988.
 - 14) 西谷全弘: 喉頭の異型扁平上皮, 扁平上皮癌の免疫組織化学的研究. *日耳鼻* 92: 78-87, 1989.
 - 15) Hsu SM, Raine R, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981.
 - 16) Sun TT, Tseng SCG, Huang AJW et al: Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: A review. *Ann NY Acad Sci* 455: 307-329, 1985.
 - 17) Moll R, Krepler R, Franke WW: Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation* 23: 256-269, 1983.
 - 18) Ramaekers F, Huysmans A, Moesker O et al: Monoclonal antibody to keratin filaments, specific for glandular epithelia and their tumors. *Lab Investigat* 49: 353-361, 1983.
 - 19) Henzen-Logmans SC, Mullink H, Ramaekers FCS et al: Expression of cytokeratins and vimentin in epithelial cells of normal and pathological thyroid tissue. *Virchow Archiv A* 410, 347-354, 1987.
 - 20) Gustafsson H, Virtanen I, Thornell L-E: Expression of cytokeratins and vimentin in salivary gland carcinomas as revealed with monoclonal antibodies. *Virchow Archiv A Pathol Anat Histopathol* 412, 515-524, 1988.
 - 21) 堤 寛: 細胞骨格; 病理学への応用: ケラチン, ビメンチン, デスミン. *病理と臨床* 5: 445-462, 1987.
 - 22) Battifora H & Kopinski M: The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J Histochem Cytochem* 34: 1095-1100, 1986.
 - 23) 川生 明: 免疫組織化学の基本技術. *病理と臨床* 6: 臨時増刊号, 3-19, 1988.
 - 24) 堤 寛: 免疫組織化学における抗体の選択とその使用上の留意点. *病理と臨床* 6: 臨時増刊号, 48-65, 1988.
 - 25) 向井万起男, 鳥潟親雄: 細胞骨格の免疫組織化学. *病理と臨床* 6: 臨時増刊号, 161-168, 1988.
 - 26) 村上 泰: 下咽頭癌の悪性度と切除範囲. *耳鼻臨床* 82: 1677-1683, 1989.
 - 27) 村上 泰, 安田範夫, 村上匡孝, 大槻晃直, 大森敦子 他: 下咽頭癌の増殖指数と粘膜下進展度. *日耳鼻* 93: 71-79, 1990.
 - 28) Wu YJ, Parker LM, Binder NE et al: The mesothelial keratins: a new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and nonkeratinizing epithelia. *Cell* 31: 693-703, 1982.
 - 29) Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M et al: Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann NY Acad Sci* 455: 282-306, 1985.
 - 30) Bartek J, Bartkova J, Papadimitriou T et al: Differential expression of keratin 19 in normal human epithelial tissue revealed by monospecific monoclonal antibodies. *Histochem J* 18: 565-575, 1986.

これらの成績の一部は文部省科学研究費一般B (課題番号01480410) によったものであり, 第111回 American Lar-

ngological Association 年次総会, 第91回日本耳鼻咽喉科学会ならびに第14回日本頭頸部腫瘍学会にて報告した。一部の抗体を供与された Dr. Elaine V. Fuchs に感謝します。

(1990年7月19日受稿 1990年9月26日受理)

別刷請求先 〒602 京都市上京区河原町通

広小路上る梶井町465

京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室 村上 泰

付 図 説 明

- 図1 正常上皮における CK-19 発現性, 基底細胞層で著しく, 棘細胞層ではわずかに認められ, 表層では認められない。(×200)
- 図2 正常上皮における CK-13 発現性, CK-19 とは全く逆のパターンで, 基底細胞層のみ陰性で, すべての supra basal layers で認められる。(×200)
- 図3 hyperkeratosis における CK-1 発現性, 基底細胞以外の角化した細胞群に著しく認められる。(×250)
- 図4 異型上皮における CK-19 発現性, 基底細胞層だけでなく, 棘細胞層にも認められる。(異型の程度に応じて陽性領域が多くなる)(×200)
- 図5 異型上皮における CK-13 発現性, 基底細胞層だけでなく, 傍基底細胞層および棘細胞層まで陰性領域が広がる。(異型の程度に応じて, 陰性領域が広がる)(×200)
- 図6 高度異型上皮における CK-19 発現性, 全層で著しい発現性を認める。(×200)
- 図7 高度異型上皮における CK-13 発現性, 全体として陰性領域が多く, 陽性細胞が不均一に散在する。(×200)
- 図8 上皮内癌における CK-19 発現性, 全層で著しい発現性を認める。(×200)
- 図9 上皮内癌における CK-13 発現性, 全層で全く認められない。(ときに, 陽性細胞の散在するものがあった)(×200)
- 図10 micro-invasive carcinoma と軽度の異型を伴う単純肥厚上皮(右2/3)の連続した部分での CK-19 発現性, carcinoma 部分では全層に著しく発現し, 肥厚上皮部分では基底細胞層で著しく, それ以外の層ではわずかに認められる。(×100)
- 図11 図10と同一部位の CK-13 発現性, CK-19 と全く逆の発現パターンを示す。(×100)
- 図12 低分化癌における CK-19 発現性, 均一に強陽性である。(×200)
- 図13 低分化癌における CK-13 発現性, 全く陰性である。(×200)
- 図14 低分化癌における CK-1 発現性, 全く陰性である。(×200)
- 図15 中等度分化癌における CK-19 発現性, 著しく発現するが不均一で, 陰性細胞も認められる。(×200)
- 図16 中等度分化癌における CK-13 発現性, 全体として不均一な発現性を示す。(×200)
- 図17 中等度分化癌における CK-1 発現性, 全く陰性である。(ときに, 陽性細胞が散在するものがあった)(×200)
- 図18 高分化癌における CK-19 発現性, 全く陰性である。(×200)
- 図19 高分化癌における CK-13 発現性, 不均一に, 主として角化細胞群で陽性を示すが, 癌真珠の中心は染色されない。(×200)
- 図20 高分化癌における CK-1 発現性, 著しい発現性を認めるが不均一で, 癌真珠の中心部は染色されない。(×200)