口腔粘表皮癌におけるメタロチオネインの免疫組織学的検討

伊藤道一郎・馬場 信行・上谷 猛・富永尚宏
徳久道生・空閑祥浩・水野明夫

Immunohistochemical studies of metallothionein (MT)
in oral mucoepidermoid carcinoma

Michi-ichirou ITOH · Nobuyuki BABA · Takeshi KAMIYA · Naohiro TOMINAGA

Michio TOKUHISA · Yoshihiro KUGA · Akio MIZUNO

Abstract: Metallothionein (MT), a low molecular weight metal binding protein, has been implicated in the proliferative activity of carcinoma cells. In this report, tissue sections from six cases of mucoepidermoid carcinoma of the oral mucosa were studied immunohistochemically to characterize the expression of MT and to evaluate implications for tumor histological differentiation. The mean percentage of MT positive cells in the mucoepidermoid carcinomas (3.1%, $n=6$) was significantly lower than those in normal oral mucosa (38.0%, $n=10$) and oral squamous cell carcinomas (56.0%, $n=7$). When analyzed according to cell type of the mucoepidermoid carcinomas, 1.1% of the mucous cells, 4.7% of the epidermoid cells, and 1.7% of the intermediate cells were positive for MT immunoreactivity. The incidence of MT expression was significantly lower than that of the normal oral mucosa and the oral squamous cell carcinomas ($p<0.001$).

Key words: metallothionein (メタロチオネイン), mucoepidermoid carcinoma (粘表皮癌)

緒 言

唾液腺に生じる粘表皮癌は、組織学的に多様な像を呈し^{1, 2)}, WHO 分類において悪性腫瘍に整理されている³⁾. 本腫瘍は、多くは外科的に摘出されるが、低分化のものは悪性腫瘍の治療に準じ、唾液腺の全摘出術、頸部郭清術、放射線治療、抗腫瘍性化学療法も行われている. このような悪性腫瘍において、治療方針の決定や予後の判定に際し、発育速度やその特性を熟知することはきわめて重要である. そこで今回、粘表皮癌の特性を知る目的で、細胞増殖との関与が示唆されているメタロチオネイン (以下 MT)⁴⁾ について、免疫組織化学的に検討した.

研究対象および方法

1. 研究対象

粘表皮癌と診断し治療を行った6症例(1987年12月より1995年5月)を対象とした.

対象症例はすべて一次症例で、年齢は49-80歳、平均年齢は64歳、性別は男性4例、女性2例であった. 発生部位は口蓋および下顎歯肉がそれぞれ3例であった. また、症状を自覚後来院までの期間は約1年以上が全体の83%で、平均3年9か月であった(表1).

2. 研究方法

生検および手術時に採取した組織片を、10%中性ホルマリンにて固定後、通法に従いパラフィン包埋し、4 μ mの連続切片を作製した. 切片は、抗MT抗体(DAKO-MT, E9)による免疫組織染色法(アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法, ABC法)にて染色した. 発色にはAEC(aminoethyl carbazole)を用い、マイヤー・ヘマトキシレンで核染色後、脱水封入し検鏡を行った. なお、免疫反応の特異性検定のための吸収試験は、第1抗体とその抗原を反応させて同一の方法で染色を行った. その結果、反応は完全に消失したので、今回の染色は特異的であることが確認

長崎大学歯学部第一口腔外科学教室
(主任: 水野明夫教授)

1st Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, Nagasaki University (Chief:
Prof. Akio Mizuno)

受付日: 平成7年12月20日

表1 病理組織学的分類およびMT陽性率

症例	年齢 性別	初発から初診 までの期間	Grade 分類 (1978, 小守ら)	WHO 分類 (1991)	MT 陽性率 (%)			
					粘液産 生細胞	扁平上皮 様細胞	中間 細胞	平均陽 性率
1	49/女	3年	II	low	2.1	4.0	0.8	2.8
2	61/男	1か月	II	low	0	8.4	0.1	2.3
3	49/男	1年	II	low	4.6	7.6	0.1	4.1
4	74/男	15年	II	high	0	5.9	2.9	3.8
5	69/男	1年4か月	II-III	high	0	1.9	2.3	2.4
6	80/女	1年2か月	II-III	high	0	0.1	3.7	3.4
平均	63.7	3年9か月			1.1	4.7	1.7	3.1

図1 正常粘膜におけるMT免疫染色(×100)
基底層に著明なMT陽性細胞が認められる。

図2 症例3 (Grade II) におけるMT免疫染色(×100)
粘液細胞(矢頭)および中間細胞(矢印)にMT陽性細胞
が認められる。

図3 症例2 (Grade II) におけるMT免疫染色(×100)
扁平上皮様細胞にMT陽性細胞が認められる。

された。また、対照群として正常部の口腔粘膜(n=10)および、口腔扁平上皮癌症例(n=7)を用いた。MT陽性率(%)は、腫瘍組織におけるMT陽性細胞の占める割合を指標とし、実際には一標本あたり10カ所から無作為に選択し、2500-3000個の腫瘍細胞を観察し、その腫瘍細胞数に対するMT陽性細胞数の平均を百分率で算出し、MT陽性率とした。統計学的検索には、t検定を用いた。

結 果

1. 病理組織学的所見

対象症例6例の分化度をみると中等度の分化を呈するもの(Grade II)4例(66.7%)、中等度ないし分化が低いもの(Grade II-III)2例(33.3%)であった。また、WHO分類ではwell differentiated type (low grade malignancy)が3例(50%)、poorly differentiated type (high grade malignancy)が3例(50%)であった。

2. 免疫組織化学的所見

1) MTの分布：口腔粘表皮癌6症例の全例に、MT陽性細胞の割合は非常に少ないが認められた。腫瘍細胞の核あるいはまた細胞質に陽性であるものが確認できた。MT陽性細胞の胞巣内の分布は、浸潤方向と思われる腫瘍胞巣周辺部にMT陽性細胞が多数認められた。正常口腔粘膜ではMTは基底層の細胞の核

に分布していた(図1)。粘表皮癌では、粘液細胞を主体とする胞巣(図2)、扁平上皮様細胞で構成される胞巣(図3)、およびその中間型の細胞で構成される胞巣(図2)にMTの陽性細胞が分布していた。

2) MT陽性率：口腔粘表皮癌6例のMT陽性率は平均 $3.1 \pm 0.7\%$ で、正常粘膜上皮10例におけるMT陽性率の平均 $38.0 \pm 7.0\%$ および口腔扁平上皮癌一次症例7例の $56.0 \pm 18.0\%$ と比較し、有意水準0.1%以下で有意差を認めた(図4)。なお、WHOによる組織学的分類別では、MTの平均陽性率はwell differentiated type (low grade malignancy)が3.1%、poorly differentiated type (high grade malignan-

図4 正常粘膜，扁平上皮癌および粘表皮癌におけるMT陽性率

cy) が3.2%で，両者間に有意差はみられなかった．粘表皮癌を構成する各細胞の平均MT陽性率は，粘液産生細胞が1.1%，扁平上皮様細胞が4.7%，中間細胞が1.7%であった(表1)．

考 察

MTの発現に関してラットなどにおける免疫組織染色では，増殖能の盛んな胎児，新生児，さらに，再生肝などで核内の強い染色性が認められている^{5, 6)}．このような高い増殖能をもつ細胞におけるMT誘導は，培養腫瘍細胞においても報告されている⁷⁾．ヒト甲状腺腫瘍におけるMTの免疫染色の報告⁸⁾はあるが，MT陽性細胞の割合については言及していない．本症例研究群でのMT陽性細胞の割合は，腫瘍全体としては非常に少ないが，浸潤方向と思われる腫瘍巣周辺部の腫瘍細胞の核および胞体に強い染色性が認められた．よって，MTが口腔粘膜上皮と口腔由来の腫瘍の細胞増殖に関わっている可能性が充分考えられた．

本研究対象の粘表皮癌症例のMT陽性率は，平均3.1%で，口腔粘膜上皮細胞の38%に比べ有意に低値を示した．もし，MTの発現が単に細胞の増殖に関与しているものであれば，今回検討した粘表皮癌症例の腫瘍細胞の増殖能は非常に低いものと考えられる．Robertら⁹⁾の粘表皮癌のPCNA(Proliferating cell nuclear antigen)陽性率は，平均7%で，Grade I, IIのPCNA陽性率は，ほとんどが10%以下で予後も良好であった．しかし，Grade IIIになるとPCNA陽性率は20-50%と高値を示し，非常に予後不良であった．本報告症例群においては，症状自覚後初診までの期間は平均3年9か月で，1例を除いてすべて1年以

上の期間を経ており，また，現在のところ再発もなく経過良好である．このことは，組織学的分類がGrade IIであったこと，さらには，MT陽性率およびMT局在がPCNAと似た傾向を示したことと関連しているのかもしれない．

結 語

- 1. 口腔粘表皮癌の特性を知る目的で，口腔粘表皮癌細胞におけるメタロチオネイン(MT)の発現について，免疫組織化学的検討を行った．
- 2. 口腔粘表皮癌6例におけるMTの平均発現率は3.1%で，正常口腔粘膜細胞および口腔扁平上皮癌におけるMTの発現率に比べ非常に低い値を示した．

稿を終えるにあたり，免疫染色に関して格別の御配慮を頂いた長崎大学医学部第三解剖学講座中根一穂教授，小路武彦助教授，和泉伸一先生，および島根医科大学第二外科学教室菱川善隆先生に心より感謝の意を表します．

引 用 文 献

- 1) 石川梧朗監修：口腔病理学Ⅱ．改訂版，永末書店，京都，1982，740-745頁．
- 2) 小守 昭：小唾液腺腫瘍—病理—．病理と臨床8：844-855 1985．
- 3) Seifert, G.: Histological typing of salivary gland tumors.; 2nd Ed, Springer-Verlag, Berlin, 1991, p20-21.
- 4) Suzuki, K.T., Imura, N., et al.: Metallothionein III. Birkhauser Verlag, Basel, 1993.
- 5) Nishimura, H., Nishimura, H. et al.: Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues. J Histochem Cytochem 37: 715-722 1989.
- 6) Tohyama, C., Nishimura, H., et al.: Immunohistochemical localization of metallothionein in the liver and kidney of cadmium or zinc treated rats. Act Histochem Cytochem 21: 91-102 1988.
- 7) Karin, M. and Herschman, H.R.: Dexamethasone stimulation of metallothionein synthesis in Hela cell culture. Science 204: 176-177 1979.
- 8) Nartey, N., Cherian, M.G., et al.: Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. Am J Pathol 129: 177-182 1987.
- 9) Robert, F.A., El-Naggar, A.K., et al.: High correlation with survival of proliferating cell nuclear antigen expression in mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland. Oto laryngol Head Neck Surg 111: 460-466 1994.