歯原性角化嚢胞上皮における Ki-67 および サイトケラチン 発現の 免疫組織化学的検討 —— 基底細胞母斑症候群の 2 例 ——

小林加代子・太田嘉英・唐木田一成
青木隆幸・山崎浩史・槻木恵一*

Immunohistochemical localization of Ki-67 and cytokeratin in odontogenic keratocysts —— Two cases of basal cell nevus syndrome ——

KOBAYASHI Kayoko・OTA Yoshihide・KARAKIDA Kazunari
AOKI Takayuki・YAMAZAKI Hiroshi・TSUKINOKI Keiichi*

Abstract: Odontogenic keratocyst (OKC) has a higher recurrence rate in patients with basal cell nevus syndrome (BCNS) than in those without BCNS. Relatively few studies have reported the characteristics of the epithelial lining of OKCs in patients with BCNS. We treated two patients with BCNS and examined the expression of Ki-67 antigen by immunohistochemical techniques to study the growth potential of the epithelial lining of OKCs. We also studied the characteristics of three cytokeratins (CK14, 17, 19) forming part of the structure of epithelial tissue. Ki-67-positive cells were primarily found in the basal and sub-basal layers of the epithelium. The epithelial lining of OKCs in patients with BCNS has high growth activity, and the staining patterns of CK14 and CK17 are useful in the diagnosis of OKC.

Key words: basal cell nevus syndrome (基底細胞母斑症候群), odontogenic keratocyst (歯原性角化嚢胞), immunohistochemical study (免疫組織化学検査), cytokeratin (サイトケラチン), Ki-67

緒 言

基底細胞母斑症候群は皮膚の基底細胞母斑、多発性顎嚢胞、骨格系の異常を主症状とする常染色体優性遺伝性疾患として知られている。このうち顎嚢胞は本症候群の60～75%に認められるとされているが¹⁾、本症候群に伴って発生する歯原性角化嚢胞の嚢装上皮の性状について検討した報告は少ない。今回われわれは基底細胞母斑症候群2例を経験し、歯原性角化嚢胞の嚢装上皮の性状を明らかにするた

めに Ki-67 および Cytokeratin (以下 CK) の免疫組織化学染色を行い検討したので報告する。

対象症例および方法

症例1: 19歳, 男性。

初診: 平成13年6月。

主訴: 左側下顎小白歯部の疼痛。

現病歴: 平成13年5月、左側下顎小白歯部の疼痛を自覚し近医歯科を受診したところ、パノラマX線写真にて透過性病変を指摘され当科へ紹介来院した。

既往歴: 幼少期に小児喘息。5歳頃より肋骨の変形を指摘されていた。

家族歴: 特記事項なし。

現症:

全身所見: 体格中等度。四肢および体幹の体毛は濃く、左側胸郭は、わずかに凹型を呈し変形を認めた。両手掌に数個の点状小窩を認めた。

東海大学医学部機能再建学系歯科・口腔外科学部門
(主任: 金子明寛教授)

*神奈川歯科大学歯学部口腔病理学教室
(主任: 渡辺是久教授)

Department of Oral Surgery, Division of Functional Reconstruction, Tokai University School of Medicine (Chief: Prof. KANEKO Akihiro)

*Department of Oral Pathology, Kanagawa Dental College (Chief: Prof. WATANABE Yoshihisa)

受付日: 2002年3月18日

採択日: 2003年3月18日

顔貌所見；鼻根部は平坦で幅広く、両眼隔離を認めた。

口腔内所見；両側上顎第2大臼歯の萌出は不完全であり、左側下顎犬歯は未萌出であった。両側下顎第2大臼歯は転位し、下顎歯肉頬移行部から口腔前庭部はびまん性に腫脹していた。

X線所見：

パノラマX線所見；左側下顎枝から右側下顎枝に及ぶ透過像を認め、内部に埋伏した両側智歯、左側犬歯が存在していた。両側上顎埋伏智歯とそれを取り囲む単胞性透過像を認めた（写真1）。

頭部X線写真所見；大脳鎌に石灰化像を認めた。

写真1 初診時パノラマX線写真（症例1）

左側下顎枝から右側下顎枝に及ぶ透過像を認め、内部に埋伏した両側智歯、左側犬歯を認める。両側上顎埋伏智歯とそれを取り囲む単胞性透過像を認める。

胸部X線写真所見；左側第3、第4肋骨に二分肋骨を認めた（写真2）。

CT所見；下顎骨は、ほぼ全域にわたって嚢胞様病変により皮質骨は菲薄化していた。両側上顎埋伏智歯が存在し、同部に上顎洞内に突出する嚢胞様病変を認めた（写真3A, B）。

写真2 胸部X線写真（症例1）

左側第3、第4肋骨に二分肋骨を認める（矢印）。

写真3 CT像（症例1）

A：下顎骨は、ほぼ全域にわたる嚢胞様病変を認め、皮質骨は菲薄化している。

B：両側上顎埋伏智歯が存在し、同部に上顎洞内に突出する嚢胞様病変を認める。

写真4 術後11か月経過時の口腔内写真(症例1)
下顎の創部はわずかに陥凹が生じているものの、上皮化している。

写真5 術後9か月経過時のパノラマX線写真(症例1)
嚢胞摘出後の骨欠損部は石灰化が進み、再発を示唆する陰影の拡大は認めない。

写真6 嚢胞壁の病理組織像(症例1, H-E染色)

- A: 嚢胞壁の上皮下結合組織内には多数の娘嚢胞と上皮島が存在している(×5).
B: 嚢胞壁は錯角化を伴う薄い重層扁平上皮で構成され、軽度の炎症性細胞浸潤を認める(×100).

臨床診断: 基底細胞母斑症候群に伴う多発性顎嚢胞。

処置および経過: 平成13年7月■, 左側下顎第2大臼歯抜歯を行い、創部から生検を施行したところ歯源性角化嚢胞の病理組織診断を得た。平成13年8月■, 全身麻酔下で下顎嚢胞摘出術、両側上顎嚢胞摘出術を施行した。下顎に対しては、8+8部の歯肉頬移行部より粘膜骨膜切開を行い、粘膜骨膜弁を翻転し頬側骨面を削除したところ、脆弱で易出血性の肉芽様組織を認めた。嚢胞を骨面から剥離するのは困難であり、摘出後に露出した下顎骨内面は粗造であったため、全周にわたり一層の骨削除を行い開放創とした。上顎に対しては 7~5, 5~7 の歯肉頬移行部より粘膜骨膜切開を行った。粘膜骨膜弁を翻転し、上顎洞前壁を削除したところ同様の肉芽様組織を認めた。健康洞粘膜を可及的に保護のうえこれを摘出し、創部は完全閉鎖した。出血量は803ml、手術時間は3時間15分であっ

た。術後、11か月間経過した現在、下唇の知覚障害など後遺症や再発を認めず経過は良好である。また下顎の創部は、軽度の陥凹を認めるものの表面は上皮化している。X線写真でも両側上顎大臼歯部、下顎ともに石灰化が進んでいる(写真4, 5)。

病理組織学的所見: 嚢胞壁は錯角化を伴う薄い重層扁平上皮と線維性結合組織で構成され、一部に慢性炎症性細胞浸潤を認めた。また、上皮下結合組織内には多数の娘嚢胞と上皮島が存在していた(写真6A, B)。

症例2: 19歳、女性。

初診: 平成6年5月■。

主訴: 右側上顎大臼歯部のびまん性の腫脹。

現病歴: 平成6年5月■頃、右側上顎大臼歯部歯肉腫脹を自覚し近医歯科を受診。パノラマX線写真にて右側上

写真7 初診時パノラマX線写真(症例2)

右側上顎埋伏智歯, 両側下顎埋伏智歯を認め, それぞれ埋伏歯周囲に辺縁明瞭なX線透過像を示す嚢胞様病変が存在している(矢印)。

顎智歯部に嚢胞様病変を指摘され, 精査加療目的に同年5月当科紹介来院した。

既往歴: 特記事項なし。

家族歴: 母親が基底細胞母斑症候群であった。

現症:

全身所見: 体格中等度。左側胸郭は一部凹型に変形し左右非対称を呈していた。

顔貌所見: 鼻根部は平坦で幅広く, 両眼隔離を認めた。

口腔内所見: 右側上顎大臼歯部はびまん性に腫脹していたが圧痛は認めなかった。下唇の知覚障害は存在しなかった。

パノラマX線所見: 右側上顎埋伏智歯, 両側下顎埋伏智歯を認め, それぞれ埋伏歯周囲に辺縁明瞭なX線透過像を示す嚢胞様病変が存在していた(写真7)。

臨床診断: 基底細胞母斑症候群に伴う多発性顎嚢胞。

処置および経過: 平成6年6月, 全身麻酔下に右側上顎嚢胞摘出術を行った。患者の希望により, 左側下顎嚢胞は手術を行わず外来にて経過観察を行ったが, 平成10年7月, 左側下顎嚢胞の増大を認めたため同年8月, 同意のもと全身麻酔下に摘出術を施行した。現在, 術後3年11か月経過しているが再発は認めず, 右側下顎智歯周囲の嚢胞様陰影も変化を認めない。

病理組織学的所見: 右側上顎嚢胞, 左側下顎嚢胞ともに嚢胞壁は錯角化を伴う重層扁平上皮で構成され, 上皮下結合組織には少数の娘嚢胞を認めた。嚢胞壁組織の一部に慢性炎症細胞浸潤が観察された。

嚢胞壁組織の免疫組織化学的検討

摘出した嚢胞壁を試料として, 裏装上皮の増殖能について免疫組織染色を行った。

1. 方法

免疫組織化学的検索は, 10%中性緩衝ホルマリン液で固定したパラフィンブロックより連続切片を作成し酵素抗体法を行った。1次抗体に抗Ki-67モノクローナル抗体MIB-1(50倍希釈, Immunothek, Mareille, France), 抗CK14モノクローナル抗体(20倍希釈, Novocastra, Newcastle, UK), 抗CK17モノクローナル抗体(50倍希釈, Novocastra, Newcastle, UK), 抗CK19モノクローナル抗体(50倍希釈, Novocastra, Newcastle, UK), 抗Cytokeratin AE1+AE3抗体(希釈済み抗体, ニチレイ, 東京), 抗Cytokeratin CAM 5.2抗体(希釈済み抗体, Becton Dickinson, 東京)をそれぞれ使用した。抗原賦活化を目的として0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)中に切片を浸漬し, 120℃, 5分間, オートクレーブ処理を行った。2次抗体以降はSAB法をヒストファインSABPO(M)キット(ニチレイ, 東京)を用いて染色した。すなわち, 通法に従い脱パラフィン操作を行い, 抗原賦活化処理を行った後, 3%過酸化水素水, 5分処理することによって内因性ペルオキシダーゼ除去を行った。さらに10%ヤギ正常血清(ニチレイ, 東京)による非特異的反応の阻害を行った後, 1次抗体を室温1時間反応させた。次いで, ビオチン標識抗マウスIgG・抗ウサギIgG抗体(ニチレイ, 東京)を2次抗体として10分室温で反応後, ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体(ニチレイ, 東京)を5分室温で反応させた後, DABで発色させた。陰性コントロール標本は1次抗体の代わりにPBSを反応させ同様に染色し, 非特異的な呈色反応のないことを確認した。

Ki-67陽性細胞の測定は染色標本を400倍の対物レンズを使用し無作為に5か所以上, 合計800個以上を測定し, その陽性細胞率の平均値を算出した。なお角化層の細胞, 炎症を伴う部位は計測から除外した。

2. 結果

Ki-67の発現は基底層および傍基底層の細胞核に認められた。また, 一部棘細胞層の上皮細胞にも観察された。症例1のKi-67陽性細胞率は18.5%, 症例2は16.8%であった。また, 患者の同意のもと, 歯原性角化嚢胞摘出時に同時に採取された口腔粘膜上皮のKi-67陽性細胞率は, それぞれ6.4%, 4.4%を示し, いずれも歯原性角化嚢胞の裏装上皮より低かった。AE1+3の局在は症例1, 2ともに裏装上皮の全層にわたり陽性を示し, 特に角化層において強陽性であった。CAM5.2においては症例1, 2ともに陰性であったが, 症例1では娘嚢胞にのみ陽性を示した。一方, 症例1のCK14の局在は裏装上皮の基底層に陽性所見を示した(写真8)。CK17は全層にわたり陽性を呈し, 特に角化層は強陽性を示した(写真9)。また, 炎症が存在する部位の裏装上皮は, 上皮突起の形成をともなう歯肉に類似した重層扁

写真8 免疫組織染色像(症例1)

CK14にて嚢胞壁の裏装上皮基底層に陽性所見を認める(×33).

写真9 免疫組織染色像(症例1)

CK17にて嚢胞壁の裏装上皮全層にわたり陽性を呈し、特に角化層は強陽性である(×33).

表1 免疫組織化学染色

	症例1	症例2
Ki-67	++ 基底層～傍基底層	++ 基底層～傍基底層
AE1+3	+++ 角化層	+++ 角化層
CAM5.2	-(娘嚢胞のみ+)	-
CK14	+++ 基底細胞層 炎症部位では全層 +++	+++ 基底細胞層 炎症部位では全層 +++
CK17	+++ 全層 炎症部位では全層 -	+++ 全層 炎症部位では全層 -
CK19	-	-

CK; cytokeratin

平上皮に形態変化が観察され、それに伴いCK14の発現は上皮の全層にわたり強陽性となるのに対し、CK17の発現は上皮全層について陰性を示した。CK19は上皮全層にわたり発現を認めなかった。症例2も同様の発現パターンを示した(表1)。また、Ki-67陽性細胞とCK発現細胞との間に特記すべき形態的相関は観察されなかった。

考 察

基底細胞母斑症候群は皮膚の基底細胞母斑、多発性顎嚢胞、大脳鎌の石灰化、二分肋骨、手掌の小窩などを主症状とする常染色体優性遺伝性疾患として知られている。本症候群の診断基準は確立されたものがなく、またこれらの臨床症状をすべて伴うとは限らない。Gundlachら²⁾によれば、多発性の基底細胞母斑と顎嚢胞の2症状があれば確実例とし、2症状のうち1つを欠く症例の場合には家族に本症候

群があるとき、また脳硬膜石灰化などの骨病変の1つを合併するならば、本症候群と診断すると述べている。症例1は、多発性顎嚢胞、二分肋骨、大脳鎌の石灰化、手掌の小窩を認め、症例2は多発性顎嚢胞、胸郭の変形と家族歴があり、Gundlachら²⁾の診断基準に合致し基底細胞母斑症候群と診断した。Gorlinら^{1, 3)}は本症候群の60~75%に多発性顎嚢胞を認め、そのほとんどは菌原性角化嚢胞であり、7歳頃より発生し10~20歳台にかけてその発育のピークを示すとしている。

菌原性角化嚢胞の治療法として、摘出術や顎骨切除が行われることが多い。これは菌原性角化嚢胞の病理組織学的特徴として、裏装上皮の増殖能が高いこと、娘嚢胞、上皮島の存在が挙げられる。そのため再発率は高く、12.0~62.0%といわれている^{4, 5)}。

また、本症候群における菌原性角化嚢胞は非症候群より再発率が高いという報告が多い^{4, 6)}。抗PCNA抗体や抗

Ki-67抗体を用いた増殖活性を検討した報告によると、本症候群に伴う歯原性角化嚢胞の裏装上皮は、陽性細胞の発現率が高く、再発率の高さが示唆されている^{7, 8)}。われわれの症例も正常粘膜上皮より高い陽性細胞率を示しており、本症候群に伴う歯原性角化嚢胞の特徴の1つである増殖活性の高さを示すものと考えられた。一方、サイトケラチン(CK)は悪性腫瘍をはじめとするさまざまな病変の上皮性マーカーとして広く用いられている。CKは種々の上皮細胞に多く含まれるタンパク質で、分子量の違いに基づきCK1~CK20に分類されている⁹⁾。また、重層扁平上皮、円柱上皮、移行上皮など上皮のタイプでそのCKの発現パターンが異なり、上皮細胞の分化との関連が特に深い。諸家の報告により角化性扁平上皮には高分子のCKが、非角化性扁平上皮には、やや低分子のCKが含まれるといわれている¹⁰⁾。AE1+3は汎サイトケラチン抗体であり、本症例においては症例1, 2ともに嚢胞壁全層において陽性所見を示した。しかし、認識する分子量の範囲が非常に広いため、歯原性角化嚢胞に特異性はなく、鑑別診断には有用性はないと思われる。CAM5.2は低分子量のCKを認識する抗体の代表であるとされている⁹⁾。特に円柱上皮などの腺系上皮に特異性をもつため、本症例においては2症例ともに陰性を示したものと思われる。症例2の娘嚢胞にのみ陽性を示したのは、角化の程度が低いため、低分子量のサイトケラチンが多く存在していたためと思われる。CK19は歯原性腫瘍上皮に、CK14は筋上皮細胞に比較的特異性が高いといわれている¹¹⁾。基底細胞母斑症候群に伴う歯原性角化嚢胞について、Mearaら¹²⁾は、非症候群のものよりもCK17に強陽性であることから特異性が高いと報告している。われわれの検討でもCK17は上皮全層に強陽性を示したが、興味深いことに上皮が炎症の影響によって棘細胞層の厚い重層扁平上皮に形態変化が生じるとその発現は陰性化した。この所見は前述のMearaら¹²⁾の報告では検討されていない。一方、CK14の発現は、CK17とは反対に炎症の影響を受けると上皮全層にわたり強陽性となった。以上の所見から、CK17とCK14の発現は歯原性角化嚢胞に特徴的に観察される錯角化を伴う菲薄な重層扁平上皮において、上皮形態と関連して発現することから、歯原性角化嚢胞の裏装上皮の分化状態を示している可能性が考えられた。また、CK19の陰性所見を含め、これらCK14, 17, 19の発現パターンの検索は歯原性角化嚢胞の免疫組織化学的鑑

別に有用である可能性が示唆された。

稿を終るにあたり、ご協力いただいた本学総合診療系病理診断学部門 安田政実講師、同付属病院病理診断科 芹沢昭彦技師に深謝いたします。

引用文献

- 1) Gorlin, R.J. and Vickers, R.A.: The multiple basal cell nevi syndrome: an analysis of a syndrome consisting of multiple nevoid basal-cell carcinoma, and hyporesponsiveness to parathormone. *Cancer* 18: 89-104 1965.
- 2) Gundlach, K.K. and Kiehn, M.: Multiple basal cell carcinomas and keratocysts-the Gorlin and Goltz syndrome. *J Maxillofac Surg* 7: 299-307 1979.
- 3) Gorlin, R.J.: Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine* 66: 98-113 1987.
- 4) Brannon, R.B.: The odontogenic keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases. Part I. Clinical Features. *Oral Surg* 42: 54-72 1976.
- 5) Rud, J., Pindborg, J.J., et al.: Odontogenic keratocyst: a follow-up study of 21 cases. *Oral Surg* 27: 323-330 1969.
- 6) 植松隆司, 浦出雅裕: 基底細胞母斑症候群における歯原性角化嚢胞の検討. *日口外誌* 38: 1431-1436 1992.
- 7) 佐藤 麗, 宇都宮忠彦, 他: 歯原性角化嚢胞の上皮増殖能に関する免疫組織化学的研究. *日大口腔科学* 25: 442-449 1999.
- 8) Li, T.J., Browne, R.M., et al.: Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS) associated lesions. *J Oral Pathol Med* 24: 221-226 1995.
- 9) 泉 美貴: 各種腫瘍における cytokeratin の発現と鑑別診断への応用. *病理と臨床* 20: 673-678 2002.
- 10) 川名以德, 山本浩嗣: 埋伏歯被膜の病理組織化学的研究. *日大口腔科学* 16: 311-323 1990.
- 11) Toth, T.: Cytokeratins 7 and 14 in special types of invasive breast carcinomas. *Med Pregl* 52: 227-232 1999.
- 12) Meara, J.G., Pilch, B.Z., et al.: Cytokeratin expression in the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg* 58: 862-865 2000.