原 著

乳腺細胞診標本におけるケラチンの局在観察

——良性と悪性の比較——

東海大学病院病理診断科¹⁾, 同 病理学教室²⁾, University of Hacettepe³⁾伊藤 仁¹⁾ Sayeste Demirezen³⁾ 篠田 玲子¹⁾赤塚 由子¹⁾ 覚道 健一²⁾ 長村 義之²⁾

乳腺悪性腫瘍および良性病変の組織標本, 捺印細胞標本を対象に細胞骨格蛋白の1つであるケラチンを免疫組織化学的に染色し, 悪性細胞と良性細胞における局在の差についての比較観察を行い, 癌化にともなうケラチンの変動について検討した. その結果細胞標本においては良性細胞は細胞質全体にびまん性に, そして特に塊状のより強い陽性反応を細胞質の片側あるいは両側に認め, 悪性細胞では細胞膜の内側にその膜に沿うように陽性局在を示す例が多く, また組織標本においても良性細胞は細胞質の腺腔側に塊状の強い陽性反応を認め, 悪性細胞では細胞膜近傍の細胞質内に細胞をふちどるように陽性局在を示し細胞標本とほぼ同様の結果を得た. これは乳腺組織の癌化において細胞骨格蛋白の1つであるケラチンの局在が変動することを示唆すると考えられる.

Key words : Breast—Immunocytochemistry—Keratin—Malignant transformation

I. はじめに

これまで乳腺において細胞膜抗原である CEA の局在が癌化とともに著しい変化を示すことが知られており, その際の細胞骨格の役割が指摘されている. その細胞骨格を構成する細胞質内線維性構造物には, マイクロフィラメント, 中間フィラメントおよび微小管の3種がある. 今回われわれは中間フィラメントの1つであり現在

19種類知られているケラチンに注目し, 乳腺悪性腫瘍および良性病変の組織標本, 細胞標本を対象にケラチンの免疫組織化学的染色を行い悪性細胞と良性細胞における局在の変化について比較観察し, 中でも乳腺に存在するといわれている⁵⁾, ケラチン8およびケラチン18に注目した. 同時にケラチンの免疫電顕的検索を行い超微形態的な局在の変化を観察した. また一部の新鮮凍結組織を用いて1次元ゲル電気泳動法によりケラチン蛋白を電気泳動し悪性腫瘍と良性病変におけるケラチンの分子量的な差についても検討したので報告する.

II. 材料および方法

1. 材 料

乳腺悪性腫瘍17例 (Ductal carcinoma 16例, Mucinous carcinoma 1例), 良性病変12例 (Fibrocystic disease 5例, Fibroadenoma 4例, Intraductal papillomatosis 2例, Fibrosis 1例) について組織標本としてホルマリン固定パラフィン切片, アルコール固定凍結切片, 細胞標本としてアルコール固定捺印標本, 免疫電顕用標本として4%パラホルムアルデヒド固定凍結切片を用いて検索した. また電気泳動用として新鮮凍結組織を

Comparative study on immunocytochemical localization of keratin in cytological specimens of patients with of benign and malignant breast lesions

Hitoshi ITO, C.T., I.A.C., Reiko SHINODA, C.T., I.A.C., Yuko AKATSUKA, C.T., I.A.C.,

Department of Clinical Pathology, Tokai University Hospital

Kenichi KAKUDO, M.D., Yoshiyuki OSAMURA, M.D.

Department of Pathology, Tokai University School of Medicine

Sayeste Demirezen, Ph.D.

University of Hacettepe

論文別刷請求先 ☎259-11 伊勢原市望星台 東海大学付属病院病理診断科 伊藤 仁

昭和62年12月10日受理

昭和63年4月15日受理

写真 1 パラフィン組織切片におけるケラチン局在非癌性組織(矢印 a)と癌組織(矢印 b)(抗ケラチン抗体 KL-1, $\times 100$)

写真 2 細胞標本におけるケラチン局在, 左: 癌細胞, 右: 良性細胞(抗ケラチン抗体 KL-1, $\times 600$)

約 0.5 g 用いた。

2. 方法

酵素抗体間接法を用いて免疫組織化学的にケラチンを染色し光顕的および免疫電顕的に観察した。光顕的観察には核染色として 1% メチルグリーン (pH 4.0) を使用した。抗体は 55~57 KD の範囲のケラチンを検出する Anti human Keratin KL-1 抗体 (Immunotech 社製, KL-1 と略す), ケラチン 8 を認識する Anti cytokeratin 8 抗体 (Amersham 社製, 抗 8 と略す), ケラチン 18 を認識する Anti cytokeratin 18 Simple epithelia 抗体 (Amersham 社製, 抗 18 と略す) の 3 種を用いた。

また新鮮凍結組織を用い一次元ゲル電気泳動を行い, 悪性腫瘍および良性病変において抗体の反応するケラチンの分子量を比較観察した。抗体は上記 KL-1 を使用した。

図 1 乳腺細胞におけるケラチンの局在様式

写真 3 パラフィン組織切片における良性細胞の塊状のケラチン局在(抗ケラチン抗体 KL-1, $\times 600$)

III. 結 果

免疫組織化学的染色を行った組織標本の観察において, 良性細胞と悪性細胞ではケラチンの局在に差異が認められた。良性細胞では細胞質に非常に強い陽性局在を示したが(写真 1 矢印 a), 悪性細胞では細胞をふちどるように細胞膜に沿って陽性局在を示す例が多く(写真 1 矢印 b), 特にこの傾向は癌細胞が充実性の発育を示す場合や Intraductal carcinoma などで細胞が大型化する際に著明であった。細胞標本においても同様に悪性細胞では, 細胞膜近傍の細胞質に細胞をふちどるようにケラチンの陽性局在を認め(写真 2 左), また良性細胞では細胞質全体に陽性反応を認め, 特に細胞質の片側, とくに両側に, より強い塊状の陽性局在を示す特徴的な陽性像が認められた(写真 2 右)。その良性細胞と悪性細胞におけるケラチンの局在様式を図 1 にシェーマで示した。良性細胞におけるこの塊状のケラチン局在は, 組織標本においても同様に認められ, 特に腺腔側に面している細胞質に多く認められた(写真 3)。抗 8, 抗 18 を用いた検

写真 4 ケラチン8の局在, 左: 癌細胞, 右: 良性細胞
(抗サイトケラチン8抗体, $\times 600$)

写真 5 ケラチン18の局在, 左: 癌細胞, 右: 良性細胞
(抗サイトケラチン18抗体, $\times 600$)

写真 6 ケラチンの免疫電顕像, 左: 癌細胞, 右: 良性細胞 (抗ケラチン抗体 KL-1)

索においても KL-1 を用いた場合と, 良性細胞においてはほぼ同様の結果を得たが, 悪性細胞では特徴的所見は得られなかった (写真 4, 5). また KL-1 および抗 18 を用いた場合は組織標本, 細胞標本ともに良好な染色性を示し, 抗 8 を用いた検索では凍結組織切片よりも捺印細胞標本がより良好な染色性を示した. 免疫電顕によるケラチンの超微形態的観察においては, 悪性細胞では細胞膜近傍の細胞質に網目状に配列すると思われるケラチン

フィラメントを認め (写真 6 左), 良性細胞では光顕的にみられたような塊状の強い陽性局在部位で束状に配列する密なケラチンフィラメントが認められた (写真 6 右). 一次元ゲル電気泳動所見は, 良性病変および悪性腫瘍例ともほぼ同じ大きさの分子量のケラチンに陽性反応のバンドを認め, 良性細胞と悪性細胞のもつケラチンが分子量的には同じである可能性を示唆した.

IV. 考 察

癌化における細胞骨格の変化については種々の報告があり、Purnell ら⁶⁾は前立腺組織を用いてケラチン、アクチン、チュブリン、カルモジュリンの局在を観察し、特にケラチンは正常および過形成の前立腺では非常に強く染色されたが癌では染色性が減弱し、またケラチン 18 を認識するモノクローナル抗体を用いた場合は良性、過形成性前立腺は強く染色されたが癌では染色されなかったと述べ腫瘍化に伴う細胞骨格の変化を報告している。われわれの結果もケラチン 8 において悪性腫瘍例では反応が減弱し、また陽性を示す細胞も少なく、ケラチンの種類が違うものの乳腺組織においても Purnell らと同様の傾向を認めた。

ケラチンの局在パターンについて Cibas ら⁷⁾は、体腔液の cell block を用いた悪性中皮腫と腺癌との鑑別において、腺癌ではケラチンが細胞辺縁をふちどるように陽性となりこの 2 種の悪性腫瘍の鑑別に有用であると報告している。また Kahn ら³⁾の報告によると、腺癌、カルチノイド、中皮腫における細胞質内ケラチン陽性パターンの観察において、DAB の発色時間を 2 分以内にすると各腫瘍に特徴的なケラチン陽性パターンを示し、腺癌では細胞膜に沿ったあるいは web-like な陽性所見を認め、分布パターンを組織診断の一助とすることも可能であると述べている。本研究における乳腺の腺癌においては、組織標本で悪性細胞が集塊を形成するような場合あるいは Intraductal carcinoma などのように細胞が大型化する例については免疫電顕的にも確かめられたように組織標本、細胞標本ともに細胞膜近傍の細胞質をふちどるような陽性局在を示し、Cibas らや Kahn らの報告とほぼ同様の結果を得た。しかし硬癌や乳頭腺管癌あるいは粘液癌などのように比較的小型な細胞が主体をなす例ではケラチンの局在パターンが判然とせず、今後免疫電顕などを加えてケラチンの微細な変化をさらに検討する必要があると考える。また良性細胞において塊状の強い陽性反応部位が存在することは興味深く、良性細胞の特徴と考えられた。

扁平上皮系のケラチンの局在の変化として Lonig ら⁴⁾は、皮膚、口腔粘膜においてその malignant transformation のなかでケラチンの局在に変化があることを報告している。また福田ら²⁾の報告によると、子宮頸部において正常扁平上皮では細胞質辺縁を中心にケラチンフィラメントが認められ、異型上皮では核周辺に集まりだし、上皮内癌では全周性に核周辺にフィラメントの集束

が観察され、このケラチンの局在様式の一連の変化は子宮頸部扁平上皮細胞の malignant transformation の過程を反映していると述べている。今回われわれの行った腺上皮の癌化における局在の変化と上記福田らの扁平上皮における局在の変化とは対照的で興味深い。

現在ケラチンは分子量および等電点を利用した 2 次元ゲル電気泳動法で 19 種類知られている。われわれが行った一次元ゲル電気泳動は分子量のみによる分画であり、したがって悪性細胞と良性細胞のもつケラチンの質的な差について論ずることはできないが、今回検索した範囲では分子量的にはほぼ同じケラチンであった。今後さらに二次元による検討が必要であると考ええる。

ケラチンの検出にはアルコール固定標本が優れているという報告は種々あるが、われわれの検索においてもアルコール固定の有用性が確認された。特に染色性の弱かった抗 8 抗体を用いた検索において、アルコール固定細胞標本が最も良好な染色性を示した。

V. 結 語

抗ケラチン抗体のなかには、凍結切片のアルコール固定標本では染色性が弱いあるいは一部分しか陽性反応を認めない例でも捺印細胞標本では良好な染色性を示す場合があり、このような種類の抗体を用いたケラチンの検出には細胞標本が有用であると考えられる。

乳腺組織の癌化において細胞骨格蛋白の一つであるケラチンの局在が変動することが示唆された。また今回検索した範囲では、良性細胞と悪性細胞のもつケラチンの種類は同一分子量のものと考えられた。今後穿刺吸引細胞診への応用が期待される。

本論文の要旨は、第 28 回日本臨床細胞学会総会・学術集会（於大阪）で発表した。

Summary

Immunocytochemical localization of keratin was studied in order to evaluate the difference between cancer cells and non-malignant cells of the breast on cytological smears and tissue sections using indirect immunoperoxidase technique.

In cytological specimens as well as histological specimens adenocarcinoma cells showed distribution of keratin along cell membrane at periphery of the cell, but benign cells had strong lump-like staining for keratin at the luminal side in the cytoplasm. These result suggested that distribution of keratin might be changed by malignant transformation and

that the difference of distribution might be helpful in differential diagnosis of aspiration biopsy specimens of the breast.

文 献

- 1) Cibas, E.S., Corson, J.M. and Pinkus, G.S. : The distinction of adenocarcinoma from malignant mesothelioma in cell blocks of effusions—The role of routine mucin histochemistry and immunohistochemical assessment of carcinoembryonic antigen, keratin proteins epithelial membrane antigen, and milk fat globule-derived antigen—, *Human Pathol.*, 18 : 67~74, 1987.
- 2) 福田耕一 : 子宮頸部病変における human Keratin Protein (hKP) の免疫細胞組織化学的検討, *日臨細胞誌*, 25 : 73~81, 1986.
- 3) Kahn, H.J., thorner, P.S., Yeger, H., et al. : Distinct keratin patterns demonstrated by immunoperoxidase staining of adenocarcinomas, carcinoids, and mesotheliomas using polyclonal and monoclonal anti-keratin antibodies, *Am. J. Clin. Pathol.*, 86 : 566~574, 1986.
- 4) Lonig, T., Viac, J., Caselitz, J., et al. : Comparative investigation of keratin-filaments in normal tissues and tumors of skin, oral mucosa, salivary glands and thymus, *Path. Res. Pract.*, 175 : 256~265, 1982.
- 5) Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., et al. : The catalog of human cytokeratins. Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell*, 31 : 11~24, 1982.
- 6) Pernell, D.M., Heatfield, B.M., Anthony, R.L., et al. : Immunohistochemistry of the cytoskeleton of human prostatic epithelium—Evidence for disturbed organization in neoplasia—, *Am. J. Pathol.*, 126 : 384~395, 1987.