原 著

子宮頸部腺癌および扁平上皮癌における
human keratin protein の免疫組織化学的研究

自治医科大学産科婦人科学教室

関口 勲 鈴木 光明 玉田 太朗

子宮頸部腺癌および扁平上皮癌を対象に, human keratin protein (ケラチン) の局在を正常頸部上皮をコントロールとして, 免疫組織化学的に研究した。

正常頸部腺上皮では, ケラチンは腺上皮に様な染色性を示し, 細胞内局在は basal および basolateral 側の細胞質に認められ, apical 側はほとんど陰性であった。これに対して, 頸部腺癌では個々の腺, また細胞間で免疫活性にばらつきがみられ, モザイク状の染色パターンを示した。また細胞内局在では basal および basolateral 側のみならず, apical 側の細胞質にも局在がみられた。正常扁平上皮ではケラチンは表層から中層の細胞に局在し, 傍基底層の一部および基底層の細胞では陰性であった。これに対して, 扁平上皮癌では正常扁平上皮に比べ全体的に染色性の低下がみられ, また組織型別では非角化型に比べ角化型癌に強い免疫活性が認められた。

一方, 細胞診を対象とした研究でも, 組織で観察された所見と同様のケラチンの局在様式の変化が認められた。これらの結果は, 癌化に伴い細胞骨格にも大きな変化が生ずることを意味するとともに, ケラチンの免疫細胞化学的染色が癌, 特に頸部腺癌の細胞診断の一助になりうることを示唆した。

Key words : Uterine cervix—Human keratin protein—Immunohistochemistry—Uterine neoplasms

I. 緒 言

すべての真核細胞に存在し, 細胞の形態保持に重要な働きをしている細胞骨格 (cytoskeleton) は, 細胞の骨格を保っているばかりでなく, 物質の細胞内輸送, 細胞の極性保持などにも大きな役割を演じているといわれて

いる。細胞骨格の構成要素はマイクロフィラメント, 微小管, 中間径フィラメントの3種からなり, このうち中間径フィラメントの構成蛋白は, 細胞の由来によって異なるため, 腫瘍の発生母地の決定などに有用性をもつといわれている。われわれは上皮性細胞の中間径フィラメントである human keratin protein (ケラチン) に着目し, 正常子宮頸部上皮における局在をコントロールとして, 腺癌あるいは扁平上皮癌では局在様式にいかなる変化を生ずるか, またケラチン染色が細胞診断の補助診断となりうるか, について検討した。

II. 対象および方法

子宮頸部腺癌 19 例, 同扁平上皮癌 9 例および正常頸部上皮 12 例を対象とした。頸部腺癌の組織型別内訳は endocervical type 13, adenosquamous type 4, endome-

Immunohistochemical study on human keratin protein in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix

Isao SEKIGUCHI, M.D., Mitsuki SUZUKI, M.D., and Taro TAMADA, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Jichi Medical School

論文別刷請求先 ☎329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311の1 自治医科大学産婦人科 関口 勲

昭和63年6月3日受付

昭和63年8月26日受理

triod type 1, adenoid cystic type 1 であり, うち 5 例に捺印細胞標本を, また 1 例は腹水より細胞標本作製した. 扁平上皮癌の組織型別内訳は large cell nonkeratinizing type 2, small cell nonkeratinizing type 3, keratinizing type 4 であり, 同時に全例捺印細胞標本作製した.

組織標本は, 手術摘出組織を 10% ホルマリンで固定し, パラフィン包埋を行い, 約 4 μ の薄切々片を作製し材料とした. 細胞標本については, スライドガラスに組織を捺印し, ただちに 95% エタノールで湿固定し材料に供した.

ケラチンの免疫組織化学的染色は酵素抗体間接法 (Nakane)¹⁴⁾ にて行った. なお, 内因性ペルオキシダーゼの阻害は 0.3% H_2O_2 加メタノールにて行った. 一次抗体は抗ヒトケラチンマウスモノクローナル抗体 (IgG) KL 1 (Immunotech 社, 55~57 KD 分子を認識)¹⁸⁾ を, また二次抗体は horseradish peroxidase 標識マウス IgG ヒツジ抗体 (F(ab')₂) (Amersham 社) を用いた. なお, 二次抗体の非特異反応阻止の目的で 10% 正常ヒツジ血清を使用した. 核染は組織標本はメチルグリーンにて, また細胞標本はハリスヘマトキシリンにて行った.

III. 結 果

1. 正常頸部腺および扁平上皮におけるケラチンの局在

正常頸部腺上皮では, ケラチンは腺上皮にほぼ一様な染色性を示し, 間質は陰性であった (写真 1). 各腺の間に, また各腺細胞の間に染色性の差はほとんどみられなかった. 細胞内局在では basal および basolateral 側の細胞質に顕著で, それに対し腺腔に面した apical 側の細胞質はほとんど陰性であった (写真 1). 細胞標本においても組織でみられたごとく, 腺細胞の核下部の細胞質に強い染色性を示す傾向を認めた (写真 6).

正常頸部扁平上皮においては, ケラチンは表層から中層細胞にかけて強い染色性を示したが, 傍基底層の一部および基底層の細胞ではほとんど陰性であった (写真 2). 細胞標本においては, 表層および中層細胞では細胞の中心部よりもむしろ辺縁の細胞質により顕著な局在が認められた (写真 7). また, 傍基底型細胞では概して細胞質全体が一様に染色される傾向を示した (写真 8).

2. 頸部腺癌および扁平上皮癌におけるケラチンの局在

頸部腺癌では, ケラチンは adenoid cystic type 以外のすべての組織型で明らかな陽性所見を示した. しかし

ながら, 正常頸部腺とは局在様式に相違がみられた. すなわち各腺の間に染色強度に差がみられ (写真 3), また個々の腺の中でもそれを構成する各細胞間で染色強度にばらつきがみられた (写真 4). また, 細胞内局在では basal および basolateral 側だけでなく apical 側の細胞質にも局在がみられた (写真 3, 4). 細胞標本においては, 腺癌細胞の中でも強い染色性を示すものと, ほとんど陰性に近いものとが混在して出現する傾向がみられ (写真 9), また細胞内局在については細胞質全体が褐染する傾向を認めた (写真 9, 10).

扁平上皮癌では, 正常扁平上皮に比べ全体的に染色性の低下が認められた. 組織型別にみると, large cell および small cell nonkeratinizing type では概して弱い染色性を示したのに対して, keratinizing type では角化傾向のみられる部位に特に顕著な免疫活性が認められた (写真 5). 細胞標本での観察では, 非角化型悪性細胞は一般に染色性が弱かったのに対し, 角化型悪性細胞では顕著な免疫活性を示した (写真 11).

IV. 考 案

上皮細胞の中間径フィラメントであるケラチンは少なくとも 19 種類の存在が確認されており, 分子量は 40~68 KD にわたっている¹²⁾. ケラチンの免疫組織化学的染色は, 上皮性腫瘍と非上皮性腫瘍の鑑別^{13,16)}, また癌腫と中皮腫の鑑別^{6,19)} に有用であるとの報告がある. 子宮頸部におけるケラチンのこれまでの免疫組織化学的研究では, 正常扁平上皮では 67 KD¹¹⁾ あるいは 58 KD¹⁵⁾ のケラチンの存在が証明されており, また扁平上皮癌⁴⁾ においてもケラチンの存在が確認されている. 一方, 正常腺上皮においては Bobrow, et al.²⁾ によって, 38 KD, 43 KD, 50 KD の低分子ケラチンの存在が証明されている. しかしながら, 子宮頸部, とくに腺上皮の癌化に伴うケラチンの局在の変化についての報告は少ない. われわれは 55~57 KD のケラチンを認識するマウスモノクローナル抗体 KL 1¹⁸⁾ を用いて, 癌化に伴う子宮頸部腺および扁平上皮におけるケラチンの局在の変化について検討した.

まず頸部腺についてであるが, 正常組織におけるケラチンの局在は, 腺上皮に一樣に認められたのに対して, 腺癌では個々の腺, また細胞間で免疫活性にばらつきがみられ, モザイク状の染色パターンを呈した. また細胞内局在にも変化がみられ, 腺癌では細胞質全体にケラチンの局在が認められるようになった. 頸部扁平上皮においても, 腺上皮ほどの顕著な変化はみられなかったもの

の,やはり癌化に伴う局在様式の変化がみられた。福田は頸部扁平上皮を対象にケラチン染色を行い,異形成,上皮内癌,扁平上皮癌の間に局在様式に相違のあることを指摘し,この一連の変化は子宮頸部扁平上皮細胞の malignant transformation の過程を反映するものであるとしている⁷⁾。また最近伊藤ら¹⁰⁾は,乳腺組織を対象に,ケラチンの免疫組織化学的染色を行い,やはり癌化に伴いケラチンの局在に変化の生ずることを示している。しかしながら,その細胞内局在はわれわれの頸部腺細胞の場合とは異なり,乳腺細胞ではむしろ良性細胞で細胞質全体がびまん性に染色する傾向を示したという。この相違の原因を現時点で結論づけることは困難である。同じ腺上皮といえども子宮頸部腺と乳腺とを同一レベルで論ずることはできない。いずれにせよ,癌化に伴い細胞骨格に大きな変化の生ずることが判明した。

また,扁平上皮癌においては組織型によりケラチンの免疫活性に差がみられ,特に keratinizing type で顕著な染色性が認められた。扁平上皮においては細胞の分化に伴い,低分子ケラチンに加え,新たに高分子ケラチンの出現をみるものが知られている^{8,11)}。すなわち扁平上皮系の細胞においては細胞の分化とケラチンの免疫活性の間に密接な関係のあることが示唆される。

一方,細胞診標本を対象とした細胞レベルの研究においても,正常頸部腺細胞と腺癌細胞の間にはケラチンの局在様式に差が認められた。このことはケラチンの免疫細胞化学的染色が癌の細胞診断の一助となる可能性を示唆するものである。一般に扁平上皮癌に比べ頸部腺癌では,初期病変の細胞診断成績は不良である^{5,17)}。この原因のひとつは,初期腺癌では細胞異型よりも構造異型が優勢である^{1,3,9,17)},ということに起因している。すなわち,従来の核所見に主眼をおいた細胞の悪性診断基準だけでは,初期腺癌のスクリーニングには自ずと限界があるものと思われる。核所見ばかりでなく,ケラチンをはじめとする細胞骨格や諸物質の産生能をも含めた細胞質の変化にも留意することにより,癌の細胞診断がより発展するものと考えられる。

稿を終るにあたり,貴重な組織標本のご提供を戴いた国立栃木病院病理・西田一巳博士,宇賀伸作次郎先生,ならびに同産婦人科前医長・村田高明博士に心より感謝いたします。

なお,本論文の要旨は第26回日本臨床細胞学会秋期大会学術講演会(1987年10月,札幌市)において発表した。

Summary

Using a monoclonal antibody to human keratin, KL 1, the localization of human keratin protein (keratin) was investigated immunohistochemically in cervical adenocarcinoma (19 cases), cervical squamous cell carcinoma (9 cases) and, as a control, in normal cervical epithelium (12 samples).

In normal endocervical glands, keratin showed uniform staining and was localized in the basal and basolateral cytoplasm but not in the apical region. On the other hand, in adenocarcinoma, the immunoreactivity of keratin varied from one gland to another or from one cell to another even in a single gland, and keratin was localized throughout the entire cytoplasm. In normal squamous epithelium, keratin was intensely positive in the upper and intermediate cell layers, but negative in some of the parabasal cells and basal layer. In squamous cell carcinoma, the immunoreactivity of keratin was weaker than that in normal squamous epithelium on the whole. Upon comparison of histological types, the keratinizing type presented relatively intense staining, although the non-keratinizing types presented only weak staining.

These findings regarding keratin localization were recognized in cytological materials and are suggested to be useful for the cytological diagnosis of cervical carcinoma, especially adenocarcinoma. The results also indicated that a change in the localization of the cytoskeleton might take place during malignant transformation of the cervical epithelium.

文 献

- 1) Ayer, B., et al.: The cytologic diagnosis of adenocarcinoma in situ of the cervix and related lesions, *Acta Cytol.*, 31: 397~411, 1987.
- 2) Bobrow, L.G., et al.: Expression of low molecular weight cytokeratin proteins in cervical neoplasia, *J. Pathol.*, 148: 135~140, 1986.
- 3) Bousfield, L., et al.: Expanded cytologic criteria for the diagnosis of adenocarcinoma in situ of the cervix and related lesions, *Acta Cytol.*, 24: 283~296, 1980.
- 4) Bychkov, V., et al.: Immunocytochemical localization of keratin in normal, dysplastic and neoplastic cervical epithelium, *Gynecol. Obstet. Invest.*, 18: 1~5, 1984.
- 5) Christopherson, W.M., et al.: Noninvasive precursor lesions of adenocarcinoma and mixed adenosquamous carcinoma of the cervix uteri, *Cancer*, 44: 975~983, 1979.
- 6) Corson, J.M., et al.: Mesothelioma: Profile of keratin

- proteins and carcinoembryonic antigen, *Am. J. Path.*, 108 : 80~88, 1982.
- 7) 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.
 - 8) Fuchs, E., et al. : Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte, *Cell*, 19 : 1033~1042, 1980.
 - 9) Gloor, E., et al. : Morphology of adenocarcinoma in situ of the uterine cervix, *Cancer*, 49 : 294~302, 1982.
 - 10) 伊藤 仁・他：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—, *日臨細胞誌*, 27, 1988. (掲載予定)
 - 11) Lönig, Th., et al. : Keratin and tissue polypeptide antigen profiles of the cervical mucosa, *Int. J. Gynecol. Path.*, 2 : 105~112, 1983.
 - 12) Moll, R., et al. : The catalog of human cytokeratins : Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell*, 31 : 11~24, 1982.
 - 13) Nagle, R.B., et al. : The use of antikeratin antibodies in the diagnosis of human neoplasms, *Am. J. Clin. Path.*, 79 : 458~466, 1983.
 - 14) Nakane, P.K. : Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 254 : 203~211, 1975.
 - 15) Schlegel, R., et al. : Immunohistochemical localization of keratin in normal human tissues, *Laboratory Investigation*, 42 : 91~96, 1980.
 - 16) Sieinski, W., et al. : Identification of prekeratin by immunofluorescence staining in the differential diagnosis of tumors, *Human Path.*, 12 : 452~457, 1981.
 - 17) 武田雅身・他：子宮頸部腺癌のスクリーニング—特に follow up 例の細胞所見の解析—, *日臨細胞誌*, 23 : 541~548, 1984.
 - 18) Viac, J., et al. : Reactivity pattern of a monoclonal antikeratin antibody (KL 1), *J. Invest. Dermatol.*, 81 : 351~354, 1983.
 - 19) Walts, A.E., et al. : Keratins of different molecular weight in exfoliated mesothelial and adenocarcinoma cells—An aid to cell identification, *Am. J. Clin. Path.*, 81 : 442~446, 1984.

写 真 説 明

- 写真 1 正常頸部腺上皮。ケラチンは腺上皮に一樣な染色性を示し、間質は陰性である。細胞内局在は basal (ノ) および basolateral 側 (ノノ) の細胞質に顕著で、apical 側の細胞質はほとんど陰性である (a)。同 normal mouse serum によるコントロール (b)。×340
- 写真 2 正常頸部扁平上皮。表層から中層細胞にかけてケラチンは陽性だが、傍基底層の一部および基底層の細胞ではほとんど陰性である (ノ)。×170
- 写真 3 内頸部型頸部腺癌。ケラチン強陽性を示す腺 (左) と弱い染色性を示す腺 (右) が混在している。basal および basolateral 側だけでなく、apical 側 (ノ) にもケラチンの局在がみられる。×340
- 写真 4 内頸部型頸部腺癌。ひとつの腺の中でも、顕著な染色性を示す細胞 (ノノ) と、弱い染色性しか示さない細胞とが混在している。basal および basolateral 側だけでなく、apical 側 (ノノ) にもケラチンの局在がみられる。×340
- 写真 5 角化型扁平上皮癌。角化傾向著明な部に一致してケラチンの顕著な染色性がみられる (ノ)。×160
- 写真 6 正常頸部腺細胞。ケラチンは腺細胞の核下部の細胞質 (ノ) に局在を認める。×1000
- 写真 7 表層および中層型頸部扁平上皮細胞。細胞の中心部よりも辺縁部の細胞質 (ノ) に局在する傾向がみられる。×880
- 写真 8 傍基底型頸部扁平上皮細胞。ケラチンは細胞質全体に一樣に局在している。×1000
- 写真 9 内頸部型頸部腺癌細胞 (腹水)。ケラチン強陽性の腺癌細胞にまじり、陰性の腺癌細胞 (ノ) がみられる。×880
- 写真10 内頸部型頸部腺癌細胞。ケラチンは細胞質全体に局在する。×880
- 写真11 扁平上皮癌細胞。角化型悪性細胞でケラチンは強陽性を示す。×880

写真 1~5

写真 6

写真 9

写真 7

写真 10

写真 8

写真 11