特 集

唾液腺腺様嚢胞癌の免疫組織学的および細胞学的解析

——穿刺吸引細胞診における検討——

塚本 徹哉^{1,2)} 坂 久代¹⁾ 小林 雅子²⁾ 上山 勇二²⁾
 谷田部 恭²⁾ 中村 栄男²⁾ 稲田 健一^{1,2)} 立松 正衛¹⁾
 越川 卓³⁾

愛知県がんセンター研究所腫瘍病理学部¹⁾, 同 病院遺伝子病理診断部²⁾, 愛知県立看護大学³⁾

Key words : Salivary gland —— Adenoid cystic carcinoma —— Fine needle aspiration —— p63 —— Cytokeratin

目的 : 唾液腺腺様嚢胞癌の形態学的および免疫組織学的解析を行い, 穿刺吸引細胞診においてその診断補助となるようなマーカーの検索を行った。

方法 : 唾液腺腺様嚢胞癌 24 例について, 上皮系細胞のマーカーとして, cytokeratin (CK), epithelial membrane antigen, carcinoembryonic antigen, 筋上皮系細胞のマーカーとして, p63, α -smooth muscle actin, S100 蛋白, CD44 variant 6, maspin, c-KIT, glial fibrillary acidic protein, vimentin, および細胞増殖のマーカーとして, Ki-67, 粘液染色として, periodic acid-Schiff, Alcian blue を行った。また, 細胞診の検体を用いて, CK と p63 の免疫染色を施行した。

結果 : 上皮系細胞のマーカーとして CK が, 筋上皮系細胞のマーカーとして p63 が, 感度, 特異性ともに最も優れており, (1) tubular type では, 内側が上皮系で, 周囲に筋上皮系が存在し, (2) cribriform type では, 筋上皮系が偽腺腔を覆い, 上皮系がその間を介在しており, (3) solid type は, 筋上皮系細胞が主体に増殖する像が得られた。細胞学的にも, cribriform type では, p63 陽性の筋上皮細胞が偽腺腔を覆い, その周囲に CK 陽性の上皮細胞が存在すること, また, tubular type では, CK 陽性の上皮細胞集塊の周囲を p63 陽性の細胞が取り巻くことが示され, 診断に有用であった。

結論 : 唾液腺腺様嚢胞癌は, 非常に多彩な組織像を示すが, 穿刺吸引細胞診において診断困難例については, CK と p63 の免疫染色による対比が有効であることが示唆された。

I. はじめに

唾液腺腫瘍の穿刺吸引細胞診は, その簡便さから近年広

く施行されるようになってきた。しかし, 唾液腺腫瘍の多彩な組織像, 出現する細胞の多彩性から, その組織型の推定は, 必ずしも容易ではない¹⁾。唾液腺腫瘍のなかでも, 腺様嚢胞癌は, 1953 年, Foote and Frazell²⁾ により初めて

Immunohistochemical and cytopathological analyses of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands

Tetsuya TSUKAMOTO^{1,2)}, M.D., Hisayo BAN¹⁾, M.T., Masako KOBAYASHI²⁾, C.T., Yuji UYEYAMA²⁾, C.T., Yasushi YATABE²⁾, M.D., Shigeo NAKAMURA²⁾, M.D., Kenichi INADA^{1,2)}, M.D., Masae TATEMATSU¹⁾, M.D., Takashi KOSHIKAWA³⁾, M.D.

¹⁾Division of Oncological Pathology, Aichi Cancer Center Research Institute

²⁾Department of Pathology and Clinical Laboratories, Aichi Cancer Center Hospital

³⁾Department of Pathology, Aichi Prefectural College of Nursing and Health

論文別刷請求先 〒464-8681 名古屋千種区鹿子殿1の1 愛知県がんセンター研究所腫瘍病理学部 塚本徹哉

平成 17 年 6 月 16 日受付

平成 17 年 11 月 28 日受理

adenoid cystic carcinoma と命名されて以来の歴史がある。臨床的には一般に長い経過をたどるが、着実に進行し、神経周囲浸潤が特徴的とされる。また、治療後も再発、転移をきたす確率の高い悪性腫瘍である^{3,4)}。腺様嚢胞癌の細胞学的診断は、cribriform type を呈する典型例では比較的容易であるが、それ以外の場合には、他の唾液腺腫瘍との鑑別が問題となることが多い。本稿では、腺様嚢胞癌の組織学的および免疫組織学的解析を行い、さらに、細胞学的考察を加え、穿刺吸引細胞診における診断の一助となるようなマーカーの検索を行った。

II. 唾液腺腺様嚢胞癌の組織学的および免疫組織学的検討

腺様嚢胞癌は、組織学的に多彩な像を呈し、大きく以下の3つの subtype に分類される。(1) 筋上皮系の腫瘍細胞が偽腺腔を形成し篩状を呈する cribriform type. 真の腺腔も存在する。(2) 管状構造を示す tubular type. (3) 充実性の solid type である。これらは、上皮系の腫瘍細胞と筋上皮系の腫瘍細胞が複雑に構成した結果である。筋上皮細胞は、上皮系細胞と平滑筋細胞、両方の性格をあわせもち、免疫組織学的に複雑な態度を示す。従来、これらの細胞の component を示すのに、cytokeratin (CK), vimentin, carcinoembryonic antigen (CEA), S100 蛋白, α -smooth muscle actin (α -SMA) 等の免疫組織学的検討が行われてきた^{5,6)}。しかし、その特異性、感受性は、満足できるものではない。近年、多くの優れた抗体が報告されてきている。p63 は、癌抑制遺伝子 p53 のホモログとして

同定され、唾液腺や乳腺の筋上皮細胞に発現している^{7,8)}。Maspin も同様に筋上皮細胞に存在し、タンパク分解酵素阻害作用を有している⁹⁾。CD44 にはいくつもの isoform が知られているが、なかでも CD44 variant 6 (CD44v6) は、漿液腺細胞、導管の基底細胞、筋上皮細胞に陽性である¹⁰⁾。また、腺様嚢胞癌で c-kit が陽性になるとの報告もある¹¹⁾。

これらの新たな抗体と従来から用いられている抗体 (Table 1) を用いて、当院で経験した 24 例の唾液腺腺様嚢胞癌について免疫組織学的に検討した。Table 1 に抗体のクローン名、抗原賦活化の条件、抗体の希釈濃度および入手先を記した。陽性細胞の比率は、Score 0 (0~5%), 1 (6~25%), 2 (26~50%), 3 (51~75%), 4 (76~100%) のようにスコア化した。Ki-67 index は、高倍 3 視野で陽性細胞数をカウントし、全細胞数に対する百分率を算出した。分裂細胞数は、高倍 50 視野で分裂像をカウントした。各組織亜型について平均 $\pm$ 標準偏差を記し、Mann-White-ney U test により統計学的に検討した。

24 例の腺様嚢胞癌の組織学的解析の結果、tubular, cribriform, solid type のものは、それぞれ、7, 15, 2 例と前 2 者が多かった (Table 2)。

免疫組織学的検討により (Table 3)、種々のマーカーは、上皮系の細胞に陽性のもの、筋上皮系の細胞に陽性のもの、特異性のないものに分類された。上皮系に陽性のものとしては、CK, epithelial membrane antigen (EMA), CEA, c-Kit であった。EMA, CEA, c-KIT は、特異性の点では、優れていたが、上皮系細胞に染色性を示さない例も多く、感度の点で十分ではなかった。CK は、上皮系細

Table 1 List of immuno and mucin histochemistry parameters

Target cells	Markers	Antibody clones	Antigen retrieval * †	Dilution	Manufacturers
Epithelium	cytokeratin	AE1/AE3	MW, CB6	100	DAKO
	epithelial membrane antigen	E29	none	100	DAKO
	carcinoembryonic antigen	II-7	MW, CB6	10	DAKO
Myoepithelium	p63	4A4	PC, TE9	100	DAKO
	α -smooth muscle actin	1A4	none	500	DAKO
	S100 protein (reacts with α and β)	polyclonal	none	1000	DAKO
	CD44 variant 6	VFF-7	MW, CB6	200	NOVOCASTRA
	maspin	G167-70	MW, CB6	150	BD Biosciences Pharmingen
	c-KIT	polyclonal	MW, CB6	500	MBL
	glial fibrillary acidic protein	6F2	AC, DW	100	DAKO
	vimentin	V9	MW, CB6	200	DAKO
	Ki-67	MIB1	MW, CB6	100	DAKO
Mucin	periodic acid-Schiff				WAKO for acid fuchsin
	Alcian blue				WAKO

* MW : microwave at 98°C for 10 min PC : pressure cooker at 118°C for 5 min AC : autoclave at 121°C for 10 min

† CB6 : 10 mM citrate buffer, pH6 TE9 : 10 mM Tris/1 mM EDTA buffer, pH9 DW : distilled water

胞に強陽性を示し、筋上皮系細胞にも陽性を示す症例もあったが、両細胞間におけるコントラストは良好であった。CK (AE1/AE3) は、一般に汎 cytokeratin 抗体として広く使用されており、低分子および中分子 keratin の同定に用いられる。AE1 は、ほとんどの acidic CK (56.5, 54, 50, 48, 40 kD のもの) に、AE3 は、既知のすべての basic CK (67, 65, 64, 59, 58, 56, 54, 52 kD) に反応することが知られており¹²⁾、54 kD の keratin を認識するモノクローナル抗体⁵⁾ や AE1/AE3¹³⁾ を用いた報告とよく合致する結果であった。筋上皮系に陽性のものは、p63, α -SMA, CD44v6, maspin, vimentin であった。従来、報告されていた vimentin¹⁴⁾ のほかに p63 が感度に優れており、甲乙つけがたかったが、p63 が間質の細胞を拾わない点で特異性に優れていた。 α -SMA や CD44v6 は、筋上皮への特異性では、優れていたが、染色されない例も存在した。Maspin は、感度の点では良好であったが、上皮系細胞とのコントラストが不明瞭な例もあった。S100 蛋白, glial fibrillary acidic protein (GFAP) は、特異性に欠けていた。また、従来からいわれているように真の腺腔内は、periodic acid-Schiff (PAS) で赤紫色を呈し、偽腺腔内は、PAS で淡赤色、Alcian blue で淡青色に染色された。上記の検討より、上皮系のマーカーとして CK, 筋上皮系のもので p63 が、感度、特異性ともに最も優れた抗体であり、その組織像より上皮系と筋上皮系細胞の interaction が明瞭に示された (Photo. 1)。

Tubular, cribriform, solid の各 subtype の Ki-67 index

Table 2 Subtypes of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands

Subtypes	n=	Ki-67 index (%)	No. mitosis /50 HPF
Tubular	7	11.22 $\pm$ 4.18 *	9.43 $\pm$ 7.35 *
Cribriform	15	16.34 $\pm$ 6.26 †	9.46 $\pm$ 9.47 *
Solid	2	47.14 $\pm$ 34.8	42.50 $\pm$ 4.95
Total	24	18.40 $\pm$ 12.65	12.21 $\pm$ 12.52

* p<0.05 vs. Solid type

† p=0.053 (NS) vs. Solid type

および分裂細胞数は、Table 2のとおりであった。前2者に有意な差は認められなかったが、いずれの指標も solid type では tubular や cribriform type に対して有意に高値であり、solid type の増殖能の高さが示された。

III. 唾液腺腺様嚢胞癌の細胞像

唾液腺腺様嚢胞癌の細胞像を示す (Photo. 2)。典型的な cribriform type では、いわゆるスイスチーズ様の形態をとり、筋上皮細胞が裏打ちする偽腺腔が特徴である^{15,16)}。偽腺腔内は、Papanicolaou 染色 (Photo. 2A) では light green 好性に、May-Giemsa 染色 (Photo. 2B) では異染性を呈し赤紫色に染色された。組織学的検討で用いた CK (Photo. 2 C, E) と p63 (Photo. 2 D, F) の免疫染色を施行した。p63 陽性筋上皮系細胞は、偽腺腔に接しその周囲を取り巻いており、CK 陽性上皮系細胞は、偽腺腔周囲あるいは筋上皮系細胞を覆うように存在した。この細胞分布は、前述の cribriform type の組織パターンともよく合致した。

しかし、細胞診の検体には、cribriform type の像を示す部位だけでなく、細胞が散在性に存在する部分が多く、時には診断に苦慮する場合がある (Photo. 3)。このような部位を注意深く観察すると、①やや大型で比較的豊富な胞体を有し、小集塊あるいは小腺腔を形成する傾向にある細胞集団 (赤矢印) と、②裸核状で孤立散在性に存在する細胞集団が種々の割合で混在していた (Photo. 3 A, B)。CK (Photo. 3C) と p63 (Photo. 3D) の免疫染色では、①の細胞が CK 陽性の上皮系細胞 (赤矢印)、②の細胞が p63 陽性の筋上皮系細胞であった。したがって、このような細胞集塊は組織像の tubular type に相当する像と考えられた。以上より、CK と p63 の免疫染色により、2種類の細胞の混在パターンを確認することが、腺様嚢胞癌の細胞診診断に有用であると考えられた。

Table 3 Average score of proteins expressed in either epithelial or myoepithelial cell types in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands

	Epithelial predominant								Myoepithelial predominant								Not specific					
Antibodies	CK		EMA		CEA		c-KIT		p63		vimentin		α-SMA		CD44v6		maspin		S100		GFAP	
Cell type *	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L	M
Score average	3.78	0.17	2.35	0.00	0.17	0.00	1.13	0.00	0.00	3.67	0.00	3.75	0.00	2.67	0.13	2.88	0.35	3.88	0.91	0.54	0.00	0.08
Score SD	0.52	0.82	1.15	0.00	0.49	0.00	1.42	0.00	0.00	1.13	0.00	0.85	0.00	1.31	0.63	1.08	1.15	0.45	0.90	0.88	0.00	0.28

* L : luminal cell M : myoepithelial cell

† Average score of 0 (0~5%), 1 (6~25%), 2 (26~50%), 3 (51~75%), or 4 (76~100%)

IV. 考 察

多彩な唾液腺腫瘍の鑑別は、時に非常に困難である。腺様嚢胞癌のみをとっても、いくつもの subtype とその移行型が存在する。唾液腺腫瘍に対する穿刺吸引細胞診は年々増加傾向にあるが、典型的な粘液球を有する cribriform type 以外は、その診断は困難である。本稿では、その補助的なマーカーとして、CK と p63 の対比が有効であることを報告した。

腺様嚢胞癌は、組織学的に以下の3つに type に分類可能であった。(i) Tubular type の腫瘍では、真の腺腔が内側にあり、筋上皮細胞が周囲を取り巻く像がみられた。正常導管では、腺上皮からなる腺管の周囲に筋上皮細胞が存在することから、tubular type が最も正常腺管の構造に類似しており、腺様嚢胞癌の初期像と考えられた。(ii) cribriform type になると、両者の細胞の位置関係が逆転し、筋上皮細胞が偽腺腔を形成する像がみられたが、tubular type から移行するような像もみられ、腫瘍の進展とともに tubular type から cribriform type に移行すると考えられた。Cribriform type のなかには、上皮成分が減少あるいは消失し、篩状というよりも網目状の形態をとる部分がみられた。(iii) 一方で cribriform type から充実性に進展していく像が得られ、solid type に移行していくと考えられた。solid type になると、上皮細胞が減少し、筋上皮細胞が主体に増殖していた。

これらの3つの subtype を臨床的に比較した報告によると、tubular, cribriform, solid type, それぞれの再発率は、59%, 89%, 100%¹⁷⁾、また、15年生存率は、それぞれ、39%, 26%, 5%¹⁸⁾であった。これらの報告は、この腫瘍が tubular type から cribriform type, さらに solid type へと進展し悪性化していくことを示唆しており、本稿における組織学的解釈や Ki-67 index, 分裂細胞数の増加ともよく合致すると考えられた。

近年、cDNA microarray を用いた網羅的解析が進行しており、唾液腺腺様嚢胞癌においても、その発現パターンが報告されている¹⁹⁾。今後、そのような解析を踏まえ、その発癌機構の解析、さらには診断、治療に結びつくような研究が必用であると考えられる。

Abstract

Objective : Epithelial and myoepithelial markers used for the diagnosis of adenoid cystic carcinomas (ACC) of the salivary gland were evaluated utilizing cytopathological and immunohistochemical

examinations of specimens obtained by fine needle aspiration cytology.

Study Design : Immunohistochemical and cytochemical analyses were performed for 24 ACC specimens using antibodies against cytokeratin (CK), epithelial membrane antigen, carcinoembryonic antigen, p63, α -smooth muscle actin, S100 protein, CD44 variant 6, maspin, c-Kit, glial fibrillary acidic protein, and vimentin. Ki-67 was utilized to evaluate cell proliferation. Periodic acid-Schiff and Alcian blue staining were performed to assess mucin production.

Results : The combination of CK and p63 antibodies produced the best results in terms of both specificity and sensitivity for the visualization of epithelial and myoepithelial cells, respectively. CK positive (+) luminal cells were localized in areas of tubular morphology, whereas p63+ myoepithelial cells faced pseudoglands in cribriform lesions. Luminal cells tended to disappear during progression toward solid type ACCs. Immunocytochemical analysis revealed myoepithelial cells on hyaline spherical globules surrounded by epithelial cells in cribriform ACCs. In the tubular type, two types of cells were mixed at various ratios; CK+ epithelial cells that tended to form small clusters and scattered p63+ myoepithelial cells with scant cytoplasm.

Conclusion : CK and p63 antibodies enable epithelial and myoepithelial cells to be clearly differentiated in ACCs and are good candidate markers for the diagnosis of salivary gland tumors.

文 献

- 1) 広川満良, 唾液腺穿刺吸引細胞診の見方. 診断病理 2001; 18: 333~338.
- 2) Foote, F.W.J., Frazell, E.L. Tumors of the major salivary glands. Cancer 1953; 6: 1065~1133.
- 3) Ellis, G.L., Auclair, P.L. Tumor of the salivary glands. Vol. 17. Washington, D. C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1996.
- 4) Rosai, J. Major and minor salivary glands. In: Ackerman's surgical pathology, 8th edition, St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1996: p. 815~856.
- 5) Chen, J.C., Gnepp, D.R., Bedrossian, C.W. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: an immunohistochemical analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1988; 65: 316~326.
- 6) 二階宏昌, 小川郁子, 高田 隆, 伊集院直邦. 唾液腺腫瘍の免疫組織化学—腫瘍性筋上皮の染色所見を中心に—. 病理と臨床 1989; 7: 574~581.
- 7) Reis-Filho, J.S., Schmitt, F.C. Taking advantage of basic research: p63 is a reliable myoepithelial and stem cell marker. Adv Anat Pathol 2002; 9: 280~289.
- 8) Bilal, H., Handra-Luca, A., Bertrand, J.C., Fouret, P.J. P63 is expressed in basal and myoepithelial cells of human normal and tumor salivary gland tissues. J Histochem Cytochem 2003; 51: 133~139.

- 9) Sternlicht, M.D., Barsky, S.H. The myoepithelial defense : a host defense against cancer. *Med Hypotheses* 1997 ; 48 : 37~46.
- 10) Fonseca, L., Moura Nunes, J.F., Soares, J. Expression of CD44 isoforms in normal salivary gland tissue : an immunohistochemical and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol* 2000 ; 114 : 483~488.
- 11) Penner, C.R., Folpe, A.L., Budnick, S.D. C-kit expression distinguishes salivary gland adenoid cystic carcinoma from polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2002 ; 15 : 687~691.
- 12) Leong, A.S.-Y., Cooper, K., Leong, F.J.W.-M. *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistochemistry*. London : Greenwich Medical Media Ltd. 2003.
- 13) Schmitt, F.C., Zelandi Filho, C., Bacchi, M.M., Castilho, E.D., Bacchi, C.E. Adenoid cystic carcinoma of trachea metastatic to the placenta. *Hum Pathol* 1989 ; 20 : 193~195.
- 14) Morinaga, S., Nakajima, T., Shimamoto, Y. Normal and neoplastic myoepithelial cells in salivary glands : an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1987 ; 18 : 1218~1226.
- 15) Orell, S.R., Sterrett, G.F., Walters, M.N.-L., Whitaker, D. Head and neck ; salivary glands. In : *Manual and Atlas of Fine Needle Aspiration Cytology*, 3rd edition. London : Churchill Livingstone, 1999 : p. 39~72.
- 16) Young, J.A., Warfield, A.T. The salivary glands. In : Gray, W., McKee, G.T., editors. *Diagnostic Cytopathology*, 2nd edition. London : Churchill Livingstone, 2003 : p. 305~324.
- 17) Perzin, K.H., Gullane, P., Clairmont, A.C. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands : a correlation of histologic features and clinical course. *Cancer* 1978 ; 42 : 265~282.
- 18) Szanto, P.A., Luna, M.A., Tortoledo, M.E., White, R.A. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer* 1984 ; 54 : 1062~1069.
- 19) Frierson, H.F., Jr., El-Naggar, A.K., Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Su, A.I., Cheng, J., et al. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol* 2002 ; 161 : 1315~1323.

写真説明

- Photo. 1** Histopathological and immunohistochemical analysis of adenoid cystic carcinomas. Tubular (A, B, and C), cribriform (D, E, and F), and solid (G, H, and I) types. H&E staining (A, D, and G). Immunohistochemistry for cytokeratin (CK) (AE1/AE3) (B, E, and H) and p63 (C, F, and I). Original magnification, $\times 200$.
- Photo. 2** Cytological findings for the cribriform type of adenoid cystic carcinoma. Myoepithelial cells are attached to the surface of hyaline globules and are usually surrounded by epithelial cells. (A) Papanicolaou staining. (B) May-Giemsa staining. (C and E) CK immunohistochemistry counterstained with hematoxylin and Alcian blue. (D and F) p63 immunohistochemistry counterstained with hematoxylin. Original magnification : $\times 320$ (B), $\times 400$ (A, C, and D), or $\times 1,000$ (E and F).
- Photo. 3** Cytological findings for the tubular type of adenoid cystic carcinoma. Epithelial cells harboring relatively abundant cytoplasm are clustered (red arrows), whereas myoepithelial cells with little cytoplasm are scattered around them. (A) Papanicolaou staining. (B) May-Giemsa staining. (C) CK immunohistochemistry counterstained with hematoxylin and Alcian blue. (D) p63 immunohistochemistry counterstained with hematoxylin. Original magnification : $\times 640$.

Photo. 1

Photo. 2

Photo. 3