

技 術

**サイトケラチン免疫染色による
癌細胞由来の鑑別について**

河野 尚秀 秋田 隆司 中村 るみ子
伊東 希美 高橋 一人 下山 則彦

Differentiation of Poorly Differentiated Carcinoma
Cell Origin by Cytokeratin Immunohistochemistry

Naohide KOHNO, Ryuji AKITA, Rumiko NAKAMURA,
Nozomi ITO, Kazuto TAKAHASHI, Norihiko SHIMOYAMA

Key words : Cytokeratin Immunohistochemistry
Colon adenocarcinoma Transitional cell carcinoma
Cell origin Cell differentiation

はじめに

臨床的・病理学的にも組織検査において腫瘍細胞の由来を鑑別・決定することは患者の予後推定, 治療方針決定のために必要不可欠である。しかし低分化悪性腫瘍の場合, 通常の染色のみでは鑑別が困難な場合がある。そのような場合は免疫染色などによる鑑別を行うが, 腫瘍の種類によっては必ずしも簡単にその由来を決定できない場合も多い。

腫瘍由来を決定する方法としては, 細胞内骨格である細胞内中間フィラメントを利用する方法がある。神経系の腫瘍が疑われる場合にはニューロフィラメント, 間質細胞の場合にはビメンチンを証明することで鑑別が可能である。上皮性腫瘍細胞の鑑別には, 腫瘍マーカーや上皮性細胞のマーカーであるサイトケラチンを利用する。上皮性細胞の細胞骨格であるサイトケラチン(以下CK)は, 上皮細胞の種類により異なり, 複数種のCKを染色することにより腫瘍細胞の鑑別が可能である。今回我々は, 複数種のCKを同時に染色することにより, 腫瘍細胞の由来を鑑別し得た事例を経験したので紹介する。

染色方法

免疫染色のブロッキング試薬, 二次抗体, 酵素標識試薬にはIMMUNOTECH社製 Ultra Tech HRP(ストレ

プトアビジン - ビオチン法)を使用した。一次抗体の反応時間は室温で1時間, その他の反応時間・手順等は能書に従った。なお, 内因性ペルオキシダーゼの除去には, 一次抗体反応前に0.3%過酸化水素加メタノールに10分間反応させている。また抗原賦活法として, 加熱処理または酵素処理を行った。賦活法の詳細は(表1)に, 使用した一次抗体のリストは(表2)にそれぞれ示した。

症 例 1

65歳女性。上行結腸癌, 左卵巣・肺・肝臓転移, 癌性腹膜炎にて手術。大網結節と左卵巣を切除された。触診において大網結節は非常に硬い腫瘍であるのに対し, 左卵巣はやわらかくcysticな部分と充実性な部分とを認め

表1 抗原賦活法

加熱法	pH6.5クエン酸緩衝液*1を満たした標本バットに標本を入れる。 圧力鍋 ³⁾ に標本バットを入れIH調理器で加熱する。 121 に達した時点で、弱火にして121 を20分間維持。 自然冷却
	* 1 三菱化学ヤトロン社製インスタントクエン酸緩衝液に1NのNaOHを加えpH6.5に調整する ⁴⁾
酵素法	0.1%トリプシン水溶液*2を標本に滴下。 湿潤箱にて37 30分間反応。
	* 2 SIGMA社製 Trypsin (T-4665)を使用。トリプシン水溶液は0.1NのNaOHでpH7.6~7.8に調整する。

表2 一次抗体のリスト

抗体名	クローン名	抗原賦活法	製造元
Cytokeratin 5 (CK5)	XM26	加熱法	Novocastra
Cytokeratin7 (CK7)	OV-TL12/30	"	"
Cytokeratin10 (CK10)	LHP1	酵素法	"
Cytokeratin13 (CK13)	KS-1A3	加熱法	"
Cytokeratin14 (CK14)	LL002	"	"
Cytokeratin17 (CK17)	E3	"	"
Cytokeratin8/18 (CK8/18)	5D3	酵素法	"
Cytokeratin19 (CK19)	b170	"	"
Cytokeratin20 (CK20)	Ks20.8	加熱法	"
Cytokeratin1/5/10/14 (CK1/5/10/14)	34 E12	"	"
-Fetoprotein (AFP)	ZSA06	なし	ZYMED
Carcinoembryonic Antigen (CEA)	11-7	加熱法	DAKO
Sialyl Lewis a Antigen (CA19-9)	TA888	なし	ZYMED
Ovarian Cancer Antigen (CA125)	Ovl85	加熱法	Novocastra

た。卵巣腫瘍が転移性なものなのか原発性か、また、大網結節が上行結腸癌由来なのか卵巣腫瘍由来の可能性があるかが問題となった。

大網結節と左卵巣に対し、CKと腫瘍マーカーによる免疫染色を行った。コントロールとして既知の腫瘍組織 (colon adenocarcinoma および卵巣の serous cystadenocarcinoma) も同時に免疫染色を実施した。大網結節の腫瘍はCK17, CK8/18, CK19, CK20で卵巣腫瘍よりも強陽性に染色され (図1), コントロールとした colon carcinoma, ovarian serous cystadenocarcinoma の染色性の差と一致した (図2)。従って、大網結節の腫瘍は colon 由来であると考えられた。染色の結果は (表3) に示した。

表3 症例1の免疫染色結果

抗体名	大網結節	左卵巣	コントロール-1 大腸癌	コントロール-2 卵巣 serous cystadenocarcinoma
CK7	(-)	(-)	(-)	(-)
CK10	(-)	(-)	(-)	(-)
CK13	(-)	(-)	(-)	(-)
CK14	(-)	(-)	(-)	(-)
CK17	一部 (+)	(-)	ごく一部 (+)	(-)
CK8/18	(+++)	(+/-)	(+)	(+/-)
CK19	(+++)	(+/-)	(+)	一部 (+)
CK20	(+)	(+/-)	一部 (+)	(-)
CK1/5/10/14	一部 (+)	(-)	(-)	(-)
CEA	(+++)	(+)	(+++)	(-)
CA19-9	ごく一部 (+)	(-)	(+)	一部 (+)
CA125	(-)	(-)	(-)	(+)

症例 2

65歳女性。下腹部腫瘍，左水腎症。仙骨への転移浸潤あり。腫瘍は尿管と卵巣に浸潤しており，卵巣由来か尿管由来かが問題となった。HE染色標本の組織形態所見からは，卵巣腫瘍は metastatic transitional cell carcinoma が疑われ，鑑別疾患として卵巣原発の移行上皮癌とされる malignant Brenner tumor が考えられた。尿管由来移行上皮癌と鑑別するため左卵巣腫瘍に対し，CKおよび腫瘍マーカーによる免疫染色を実施した。またコントロールとして既知の膀胱由来 transitional cell carcinoma と卵巣 Brenner tumor も同時に免疫染色を実施した。免疫染色の結果は (表4) に示した。

左卵巣腫瘍は，コントロールとして染色した膀胱由来 transitional cell carcinoma の染色パターンとはCK7, CK13, CK17, CK8/18, CK19, CK1/5/10/14が陽性である点で一致した。また Brenner tumor とは，CK17において染色性に差が認められた (図3)。以上の免疫染色結果と，HE染色標本との所見から，左卵巣腫瘍は metastatic transitional cell carcinoma であると考えられた。

考 察

上皮性腫瘍細胞の由来を免疫染色によって鑑別する方法として，腫瘍細胞産生物質を染色する場合と，細胞構成成分を染色する2つの方法に大別できる。

腫瘍細胞の産生物質としては腫瘍細胞が特異的に，あるいは大量に産生する腫瘍マーカー，分化した細胞が特異的に産生する粘液内の糖タンパク質やホルモン類，あるいは前立腺酸ホスファターゼといった臓器特異的酵素の

表4 症例2の免疫染色結果

抗体名	症例2 左卵巣	コントロール-3 膀胱移行上皮癌	コントロール-4 卵巣プレナー腫瘍
CK5	一部 (+)	(++)	(+)
CK7	(+++)	(+++)	(+++)
CK10	(-)	(-)	(-)
CK13	一部 (+)	(+)	(+)
CK14	(-)	(-)	(-)
CK17	(++)	(++)	(-)
CK8/18	(+)	(++)	(+++)
CK19	(++)	(+++)	(+++)
CK20	一部 (+)	(-)	(-)
CK1/5/10/14	(+)	(+++)	(+++)
AFP	(-)	(-)	(-)
CEA	(-)	(-)	(-)
CA19-9	(-)	(-)	(-)
CA125	(-)	(-)	(-)

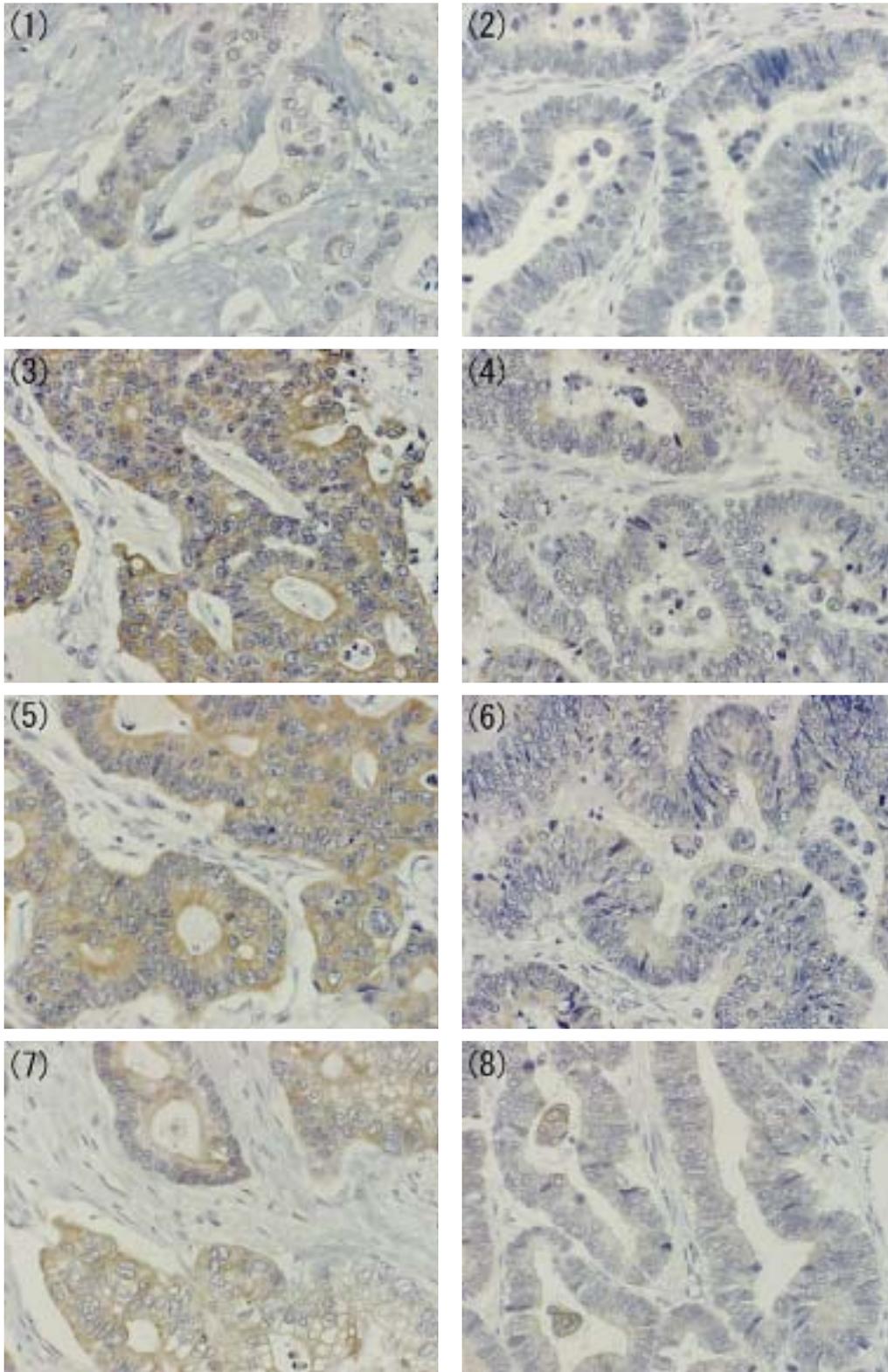


図1 症例1の免疫染色

- | | |
|----------------------|---------------------|
| (1) 大網結節 CK17対物40倍 | (2) 左卵巢 CK17対物40倍 |
| (3) 大網結節 CK8/18対物40倍 | (4) 左卵巢 CK8/18対物40倍 |
| (5) 大網結節 CK19対物40倍 | (6) 左卵巢 CK19対物40倍 |
| (7) 大網結節 CK20対物40倍 | (8) 左卵巢 CK20対物40倍 |

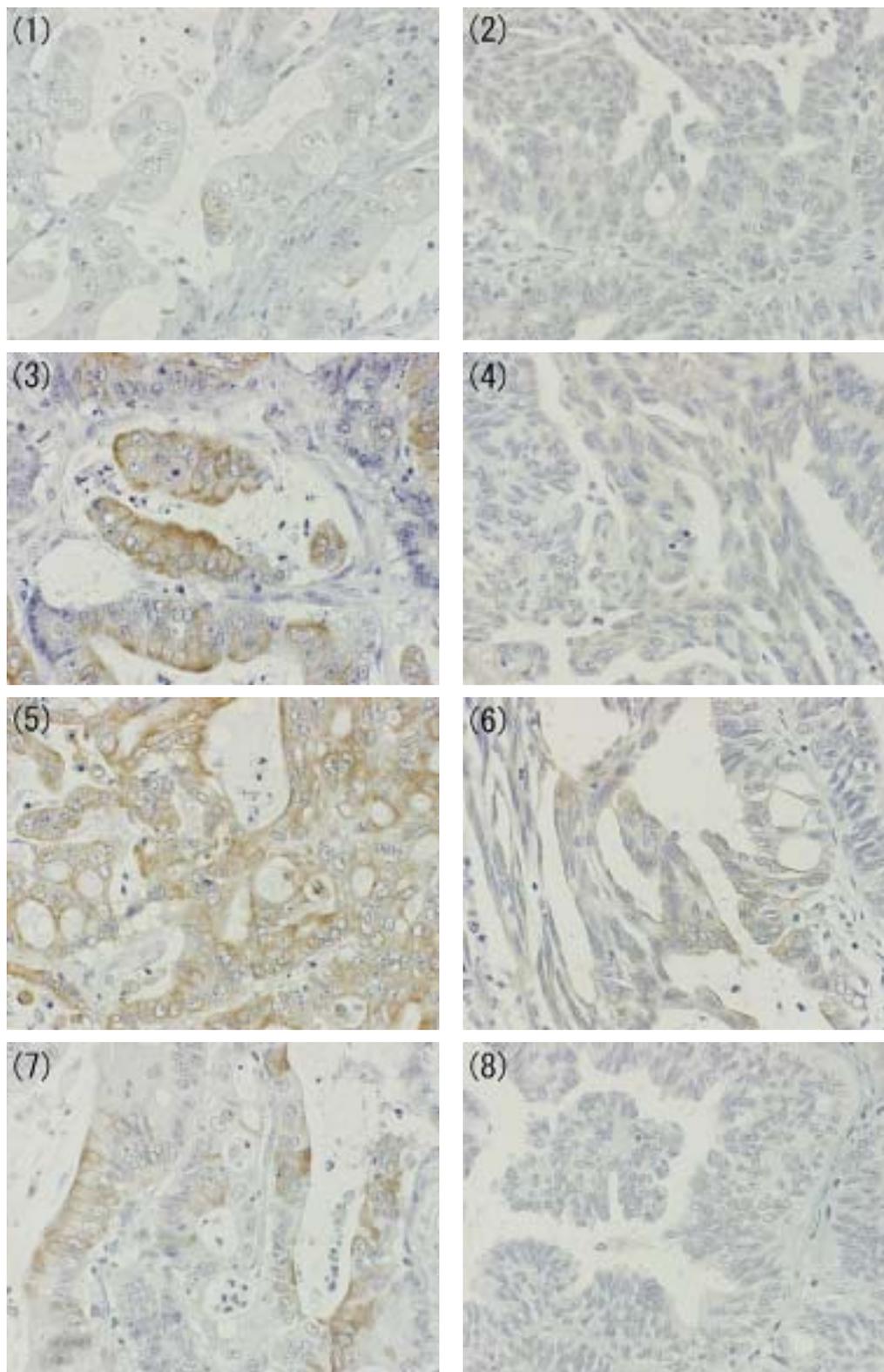


図2 コントロールの免疫染色

- | | |
|---------------------|--|
| (1) 大腸癌 CK17対物40倍 | (2) 卵巣 serous cystadenocarcinoma CK17対物40倍 |
| (3) 大腸癌 CK8/18対物40倍 | (4) 卵巣 serous cystadenocarcinoma CK8/18対物40倍 |
| (5) 大腸癌 CK19対物40倍 | (6) 卵巣 serous cystadenocarcinoma CK19対物40倍 |
| (7) 大腸癌 CK20対物40倍 | (8) 卵巣 serous cystadenocarcinoma CK20対物40倍 |

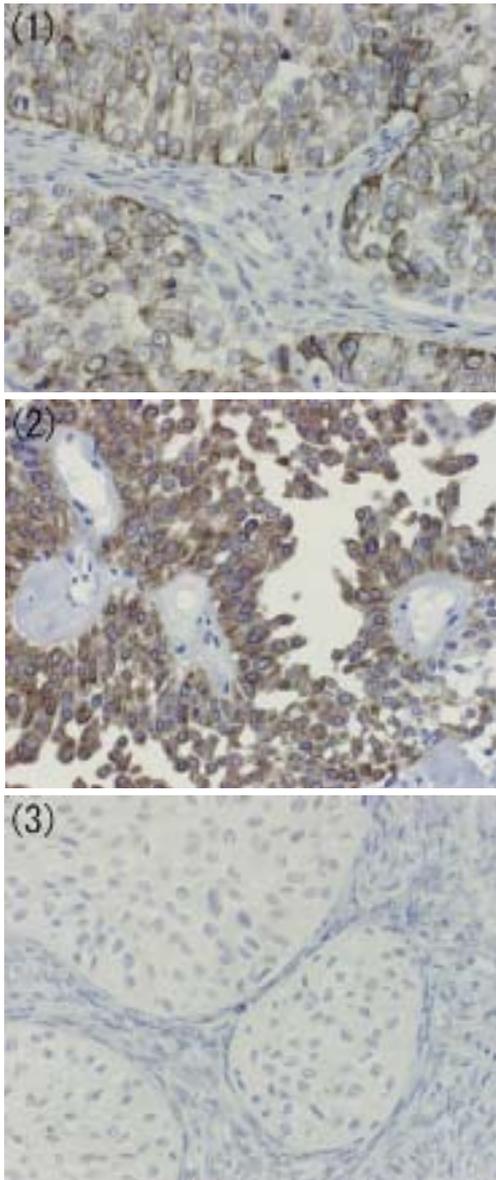


図3 症例2とコントロールの免疫染色

- (1) 症例2 左卵巣 CK17対物40倍
- (2) コントロール 膀胱癌 CK17対物40倍
- (3) コントロール プレンナー腫瘍 CK17対物40倍

類があげられる。細胞構成成分としては、細胞骨格を形成するCKや、細胞膜を構成するタンパク質の類がある。

腫瘍細胞の産生物質を染色する方法では、産生物質の部位特異性が高く、正常細胞と同様の物質が産生されていた場合には、その細胞由来を決定する有効な手段である。しかし、その産生物質の部位特異性が低い場合には細胞由来決定の役には立たない。また、腫瘍化した細胞において産生能が低下したり、抗原決定部位の構造が変化した場合、染色性が低下あるいは失われることにより細胞由来の決定が不可能となる。

一方、細胞成分そのものを検索する方法は、腫瘍細胞

産生物質による鑑別が不可能な場合においても、腫瘍細胞がある程度分化している場合には細胞骨格や各種の細胞膜受容体が存在している場合も多く、鑑別法としての有用性は高い。

今回検討したCKは分子量や生化学的性格により、現在およそ20種類に分類されている¹⁾。CKの分布は、例えば重層扁平上皮ではCK5/14を、消化管粘膜や腺の導管などで認められる単層円柱上皮ではCK7やCK8/18, CK19, CK20が認められる。また単層円柱上皮でもCK7は胆管や乳管などで多く見られるが、腸管では見られないことが多く、逆にCK20は大腸や胆管で多く見られ、乳管ではほとんど見られないことが知られている²⁾。しかしながら文献上にすべての腫瘍についての鑑別点が挙げられているわけではなく、鑑別点が不明の場合には鑑別対象とする組織・腫瘍をコントロールとして、対象とする腫瘍との染色パターンを比較しその由来を決定することが必要となる。今回鑑別のために行った免疫染色は、文献上明らかな鑑別点が報告されていない腫瘍間での鑑別のための染色であった。

症例1の免疫染色ではCEAやCA19-9は複数種の上皮腫瘍で陽性のため、重複癌の場合、転移性腫瘍細胞の細胞由来は腫瘍マーカーのみでの鑑別が困難であった。しかし9種類のCKの染色パターンとコントロール腫瘍との染色性の比較により、腫瘍細胞の由来決定が可能となった。

症例2においては4種類の腫瘍マーカー全てが免疫染色では陰性となったため、腫瘍マーカーのみでの鑑別は不可能であった。コントロールとして染色したtransitional cell carcinomaとBrenner tumorの染色パターンでは、CK10種類中CK17の1種類に明らかな差異が認められた。本腫瘍がコントロールの尿路由来移行上皮と同様の染色性を示したため両者を鑑別することが可能であった。

CKを染色する上での問題点としては、一般的な免疫染色上の問題点と、CK特有の問題点があげられる。一般的な免疫染色上の問題点としては、腫瘍化による抗原そのものの変化と、手技上の抗原性の保存における問題点である。腫瘍化によってCKの抗原性の低下や異所性の発現があった場合には正常細胞とは異なるCK陽性パターンとなる場合がある。症例2ではコントロールでは卵巣腫瘍、膀胱癌双方で陰性であったCK20が陽性となっている。手技上の抗原性の保存に関しては過固定を避けることや適切な固定液の選択に注意する必要がある。当院においては通常手術標本は摘出後24時間以内に切り出しをするために過固定は原則的にありえず、抗原性の保存は良好である。固定条件に関しては時に大きな標本において適切な割を施さず、切り出し時に標本内に

未固定な部分がある場合が問題となる。良好な抗原保存性が求められる場合には固定液を中性緩衝ホルマリンとすることでほとんどの場合は問題はない。

CK 特有の問題点としてはホルマリン固定により抗原性が低下しやすいため、各種抗原賦活法が必要なことがあげられる。適切な抗原賦活条件を実験的に求め、最適な賦活条件を設定した後に免疫染色をしなければならない。また固定条件によってはなお再現性が悪い場合もあり、種々の賦活・染色条件を試すことが必要な場合もあることを念頭におくことが必要である。

ま と め

腫瘍マーカーをはじめとする腫瘍細胞産生物質の染色に加え、細胞骨格成分である複数のサイトケラチンを検索することで、腫瘍細胞の由来鑑別が正確に出来ると考えられた。免疫染色法に共通する問題点、サイトケラチン染色特有の問題点があり、よりの確な染色・判定が可

能となるよう検討を続けていきたい。

文 献

- 1) Chu P G & Weiss L M : Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002, 40, 403-439.
- 2) Novocastra Laboratories Ltd. : Cytokeratin Expression in Tissues and Cells. 2003/04 PRODUCT RANGE ; 106-112.
- 3) 丸川活司, 森谷 純, 清水幹雄ほか : より良好な免疫染色の追求 ~ 圧力鍋を用いた抗原賦活化と精度管理 . *医学検査* 2002. 51(11) ; 1503-1508.
- 4) 濱川真治, 柏崎好美, 進藤久仁子ほか : 抗 CD 4 モノクローナル抗体 (clone ; 1F6) を用いる酵素抗体法染色の加熱処理抗原賦活化の検討 ~ クエン酸・クエン酸 3 ナトリウム・NaOH 溶液 (pH7.0) の有用性 ~ . *病理と臨床* 1999. 17(11) ; 1201-1205.