

口腔扁平上皮癌における脈管侵襲の組織学的検討

西原 安那¹ 大木 秀郎^{1,3} 尾曲 大輔^{2,3}

¹ 日本大学歯学部口腔外科学講座, ² 日本大学歯学部病理学講座

³ 日本大学歯学部総合歯学研究所生体防御部門

要旨：口腔領域における癌の発生は著しいQOLの低下を伴う。口腔における早期癌の5年生存率は90%と良好であるのに対し、進行癌では依然として予後不良の転帰をとることが多い。さらに、その予後は他部位に発生した悪性腫瘍と同様に発生部位や転移などに左右される。癌の転移は、脈管を侵襲し、遠隔臓器の脈管壁への着床および浸潤・増殖することで成立する。脈管はCD34などの血管内皮マーカーを用いて免疫組織学的に評価されるが、主に用いられるヘマトキシリンによる対比染色では、脈管侵襲の評価に苦慮することが少なくない。そこで本研究では、口腔粘膜標本を用いて、血管内皮マーカーであるCD34の免疫組織学的同定と対比染色の組合せを検討した。口腔癌切除材料を対象として、CD34の免疫染色を行った。CD34の発色にはHRPおよびALPを用い、対比染色には、一般的に用いられるヘマトキシリン以外の色素を用いて評価した。その結果、HE染色との共染色では、CD34とHE染色から得られる情報が1枚の標本から採取でき、判定に苦慮することが少なかった。また、CD34の発色と反対色で染めた組合せにおいても脈管の状態が詳細に観察することができたが、リンパ球の浸潤の程度や充血、浮腫などの結合組織から得られる情報量がHE染色に比べ乏しく、さらなる検討の必要性が示唆された。

キーワード：口腔扁平上皮癌, 脈管, 免疫染色, CD34

緒 言

口腔は豊かな人間生活を営む上で重要な器官であり、歯を含む複雑な構造を有している。口腔領域における癌の発生は著しいQOLの低下を伴う。口腔は、歯以外を重層扁平上皮からなる粘膜に被覆された器官であり、口腔粘膜に発生する悪性腫瘍の90%以上が病理組織学的に扁平上皮癌である。口腔における早期癌では5年生存率が90%以上と良好な結果を得ている^{1,2)}のに対し、進行癌では依然として予後不良な転帰を経るのが現状である^{3,4)}。口腔癌の予後は、他部位に発生した悪性腫瘍と同様に、その発生部位、大きさ、深達度、リンパ節転移の有無などによって大きく左右される。癌の転移にリンパ行性転移と血行性転移があり、これらはリンパ管、血管を侵襲し、遠隔臓器の脈管壁への着床および浸潤・増殖することによって成立する⁵⁾。口腔癌取扱い規約⁶⁾では、病理所見の記載項目として、リンパ管侵襲(ly)と静脈侵襲(v)が挙げられている。一般的にこれらの記載事項は、HE染色標本を用いて病理医によって判定されており、その記載内容に基づいて臨床医は治療方針を決定している。しかし、脈管侵襲の有無やその程度の判定に、病理医間での相違が見られ、臨床上きわめて重大な問題となることがある。その要因として、HE染色標本のみを用いた判定であり、血管内皮細胞やリンパ管の同定が難しく、lyとvの判定には病理医個々の力量や主観的判断によるところが多いことが考えられる。こうした問題の克

服に免疫組織学的な手法は有用である。脈管の客観的評価には、内皮細胞のマーカーであるCD31やCD34, podoplanin, 第Ⅷ因子関連抗原などを用いた免疫組織化学的検索が行われる。これは当該分子の存在をDABなどの試薬を用いて発色させるが、その際、対比染色としてヘマトキシリンが用いられることが多い。しかし、実際の病理診断の現場においては、ヘマトキシリンによる核染色では腫瘍細胞の存在が明瞭に判定できず脈管侵襲の判定に苦慮する 경우가少なくない。

そこで本研究では、血管内皮細胞マーカーであるCD34の免疫組織学的同定において、一般的に用いられるヘマトキシリン以外の色素を用いることにより、脈管侵襲をより明瞭に判定する方法がないかという点に着目し検討を加えた。

材料および方法

1. 資料

日本大学歯学部付属歯科病院口腔外科で治療目的に外科的に切除され、病理診断科においてsquamous cell carcinomaの診断がなされた症例を無作為に抽出し、対象症例とした。なお資料の採取は、日本大学歯学部倫理委員会(承認番号:2015-11)の規定に基づいて行った。

2. 抗体および試薬

一次抗体として抗CD34抗体(Dako, クローン:QBEnd10, mouse monoclonal)を用いた。二次抗体については,envision system anti-mouse and rabbit(Dako),

(受付:平成30年7月3日)

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

ヒストファインシンプルステイン AP(M) (ニチレイ) を用いた。HE 染色用試薬として mayer's haematoxylin solution (和光), 1% eosin Y solution (和光), 対比染色用の試薬として, light green SFY (和光), metanil yellow (和光), を用いた。

3. HE 染色

病変部を含む任意に抽出した舌の一部(ホルマリン固定後のパラフィン切片)を $4\mu\text{m}$ に薄切し, 通法による HE 染色を行った。まず, キシレンを用いてパラフィン除去操作を行った。次に純エタノールを通してキシレンをエタノールに置換し, 更に低濃度のエタノールを通して最後に水洗いをした。次に核染色を行うため, ヘマトキシリン溶液を用いた。標本をヘマトキシリン溶液に 5 分浸漬した後, 水洗した。対比染色としてエオジン溶液を用いて行い, 5 分程浸漬した後, 水洗した。水洗後には脱水, 透徹操作を行った。まず標本の水分をエタノールにて取り除くため, 80%エタノール, 95%エタノール, 無水エタノールの順番に標本を馴染ませ, 水分をエタノールに置換した。次にキシレンを用いて標本を透徹し, 封入操作を行った。

4. 免疫染色

HE 染色と同様に, キシレン, 純アルコールで脱パラフィン処理後, 0.3% H_2O_2 メタノールに 20 分間, 室温にて浸漬し, 内因性ペルオキシダーゼ活性の不活化を行った。Phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄後, 98°C のクエン酸 buffer にて 20 分間の抗原賦活化処理し, 1% 牛血清アルブミン追加 PBS (1% BSA-PBS) で室温にて 1 時間, blocking を行った。その後, 抗 CD34 抗体を PBS にて 100 倍希釈し, 1 次抗体として 4°C , overnight で反応させた。0.1% Tween20 添加 PBS (0.1% PBST) による洗浄後, 2 次抗体は, envision system anti-mouse and rabbit (Dako) あるいはヒストファインシンプルステイン AP(M) (ニチレイ) を用いて, 室温にて 1 時間静置, 0.1% PBST で洗浄後に発色を前者については 3,3-diamino benzidine tetrahydrochloride (DAB, SIGMA) 発色基質 (PBS, 0.01% 過酸化水素, 0.02% DAB), 後者はヒストファインアルカリフォスファターゼ基質キットを用いてそれぞれ 15 分間反応させ, 発色させた。水洗後にヘマトキシリン溶液による核染色を 5 分間行い, 水洗後に脱水, 透徹, 封入を行った。

5. 共染色

CD34 の免疫染色は, 4. と同様に発色まで行った。発色後に水洗を行い, 核染色の代わりとして, HE 染色や 0.2% light green 溶液 (light green SFY, 0.5% 酢酸水溶液), 0.2% metanil yellow 溶液に 10 ~ 20 分間の浸漬を行った。その後に水洗を行い, 脱水, 透徹, 封入を行った。

6. 脈管の判定

脈管の判定については, 免疫組織学的に CD34 は血管

内皮細胞やリンパ管内皮細胞に陽性となるので著者のうちの 2 人が行い, CD34 に陽性を示し管腔構造が明瞭なものはそのまま脈管として計測し, CD34 に陽性を示すが管腔構造が不明瞭なものは 2 個以上の細胞からなるものを脈管として計測した。

結 果

1. HE 染色

HE 染色像では, 被覆上皮に連続して生じた高分化型扁平上皮癌を認めた (図 1 a)。強拡大において腫瘍胞巣の周囲に複数の毛細血管やリンパ管を確認することができ, 管腔内に赤血球をいれた微小な脈管についても比較的観察は容易であった。また, 管腔内に腫瘍が乳頭状に浸潤する像も観察された (図 1 b)。

2. 免疫染色

通法による CD34 の免疫染色像では腫瘍間質における拡張した脈管の観察は容易であった。さらに, HE 染色では確認できなかった微小な脈管や artifact との鑑別が困難であったのに対し, CD34 の DAB 発色 (CD34-HRP) や ALP 基質発色 (CD34-ALP) による脈管の観察は容易であった。腫瘍に近接した空胞状構造物が脈管であり, 脈管を取り囲むように浸潤していることも観察できた (図 2, 3)。

3. HE 染色との共染色

CD34-HRP と HE 染色の共染色の場合, 脈管の DAB による茶色とエオジンによる線維性間質の赤色が重なり, 赤茶色として観察することができた。拡張した毛細血管では, 内皮細胞の観察もしやすく脈管の鑑別は容易であり, 一部の脈管内に腫瘍集塊も観察できた。微小な脈管においては赤茶色の塊のようにもみえた。しかし, エオジンによる周囲組織の赤色との鑑別は比較的容易であった (図 4)。

4. light green との共染色

CD34-HRP および CD34-ALP と light green との共染色においては, 大小不同のさまざまな脈管の観察は比較的容易であった。しかし, 脈管が分布する結合組織の像が不明瞭になってしまい観察が難しく, リンパ管と血管の鑑別は困難であり, また周囲の腫瘍実質も不明瞭であった (図 5, 6)。

5. Metanil yellow との共染色

CD34-HRP および CD34-ALP と metanil yellow との共染色においては, 大きく拡張した脈管の観察は比較的容易であった。しかし, 脈管が分布する結合組織の像が不明瞭という点において light green との共染色と同様の結果であり, リンパ管と血管の鑑別や腫瘍実質の形態について不明瞭であった (図 7, 8)。

口腔癌における脈管侵襲の組織学的検討

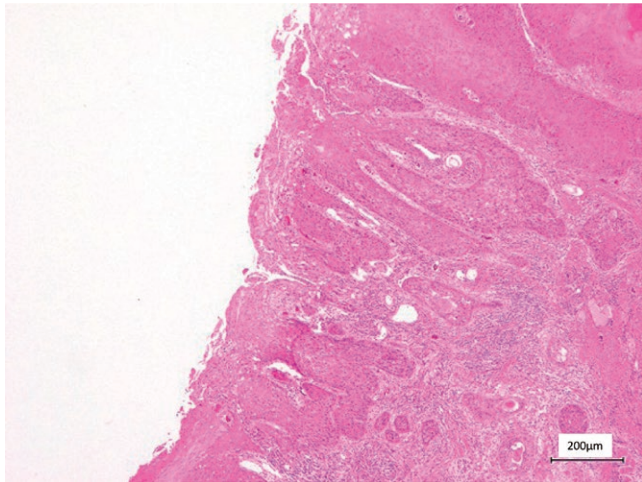


図1 a 重層扁平上皮癌 (HE 染色)
被覆上皮に連続する高分化型の扁平上皮癌をみる。

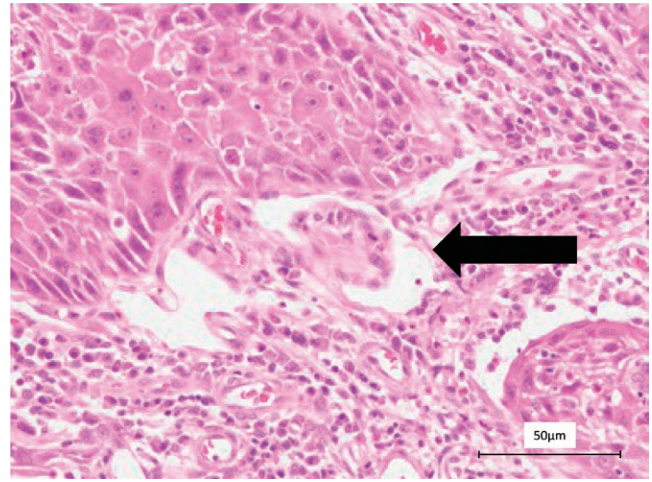


図1 b 重層扁平上皮癌 (HE 染色)
管腔内への乳頭状の浸潤像を認める(矢印)。

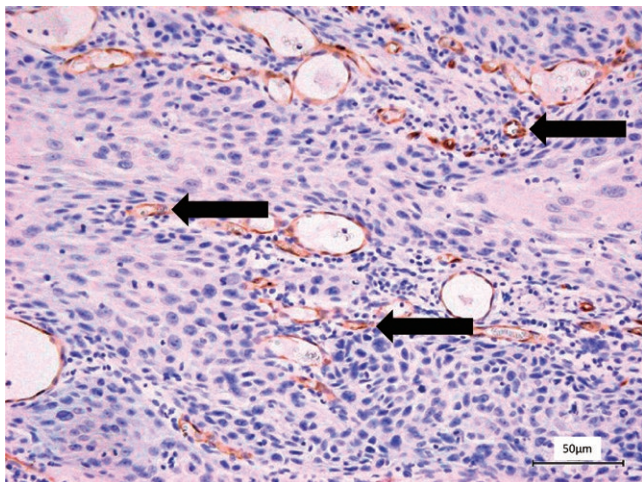


図2 CD34-HRP + ヘマトキシリン染色
DAB 発色により CD34 陽性細胞からなる微小な脈管の存在も確認できる(矢印)。

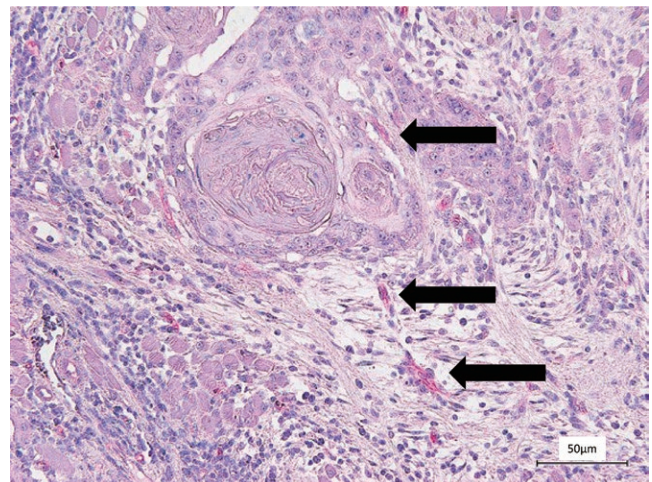


図3 CD34-ALP + ヘマトキシリン染色
図2 同様に ALP 発色基質により CD34 陽性細胞からなる微小な脈管の存在も確認できる(矢印)。

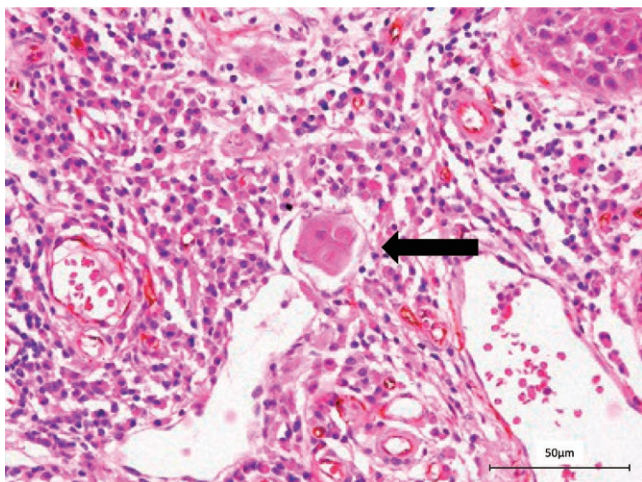


図4 CD34-HRP + HE 染色
脈管内に腫瘍集塊をみる(矢印)。

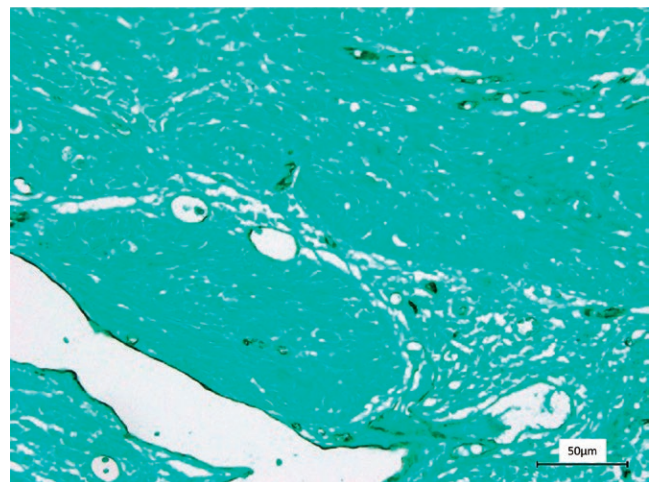


図5 CD34-HRP + light green 染色
DAB 発色で相対的に茶色にされた脈管の観察は容易であるが、腫瘍実質と間質が不明瞭であった。

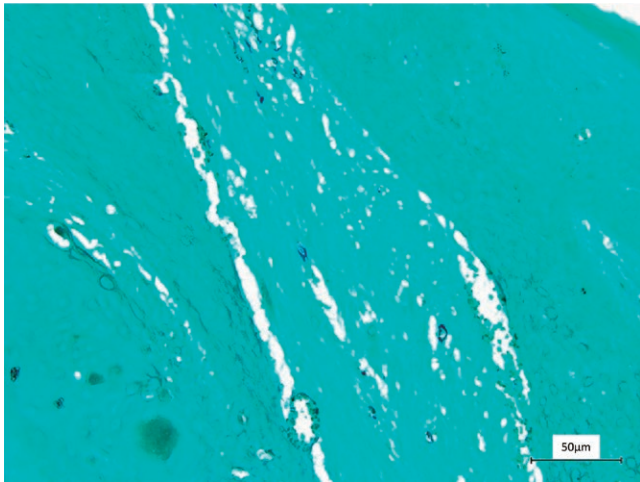


図6 CD34-ALP + light green 染色
ALP 発色基質により相対的に黒色を示す脈管の観察は容易であるが、腫瘍実質と間質が不明瞭であった。

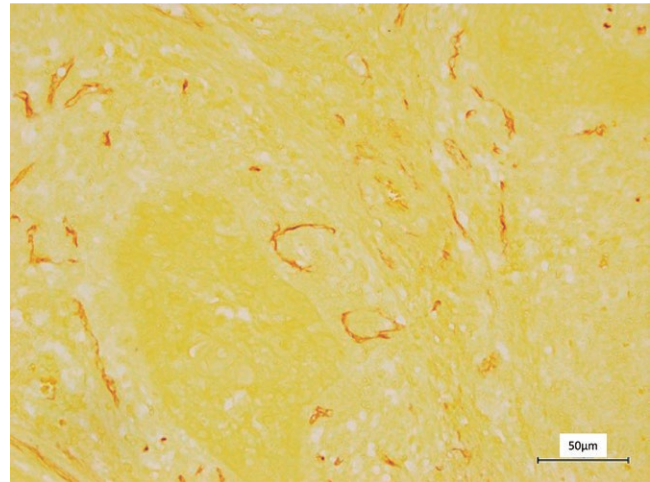


図7 CD34-HRP + Metanil yellow 染色
DAB 発色で茶色に染色された脈管の観察は容易であるが、腫瘍実質と間質が不明瞭であった。

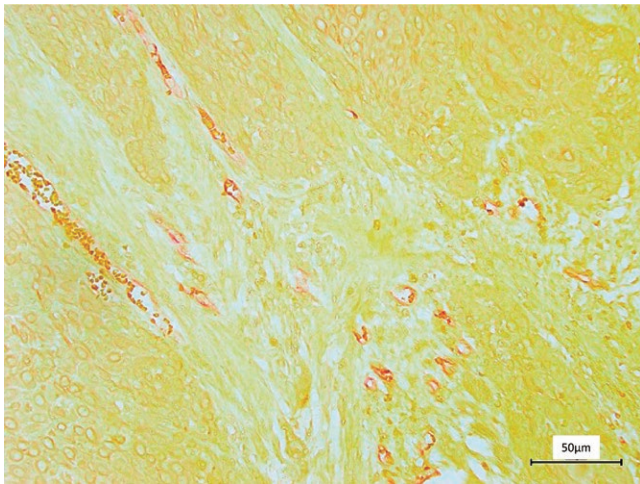


図8 脈管の CD34-ALP + Metanil yellow 染色
ALP 発色基質で赤色に染色された脈管の観察は容易であるが、腫瘍実質と間質が不明瞭であった。

考 察

口腔がんは口腔領域に発生する悪性腫瘍の総称である。口腔は歯以外が扁平上皮からなる粘膜で被覆されており、病理組織学的に口腔がんの90%以上は扁平上皮癌である。口腔癌取扱い規約には病理診断項目として脈管侵襲が定められているが、その判定は難しいと思われる。それは、リンパ管侵襲(ly 因子)、血管侵襲(v 因子)を記載するとあるが実際の判定基準については記載されていないためである⁶⁾。さらに、HE染色において形態学的特徴のみでの判定をルーチンワークで行い、リンパ管の内皮細胞の同定や内腔がほとんど確認できない脈管の同定が困難だからである。このことは口腔扁平上皮癌に限らず、大腸癌など他部位で発生したものについても同様である⁷⁻¹¹⁾。また、大腸癌の場合は、脈管侵襲の判定に

リンパ節転移の有無を考慮するという報告もある¹⁰⁾。大腸癌の浸潤先端部分の間質においてはしばしば細胞1個または数個程度の小さな島状癌細胞集塊が観察される。これは budding と呼ばれ、これが高頻度に見られる症例では低頻度な症例に比べ予後が有意に悪いことが明らかになり、新しい悪性度規定因子として最近注目されている。それは少数の細胞からなる集塊が、腫瘍間質に存在するのかわ腫瘍塞栓のように脈管内に存在するのかわの違いで、予後に大きな影響を与えると考えられるためである。そこで、我々は、脈管を確実に判別するため、CD34による免疫染色を行い、同一標本内でのHE染色やそれ以外の対比染色を行った。その結果は、CD34の発色色素とその周囲間質を反対色で染色することが観察しやすいということであり、単純な色相環での色の組み合わせによるものであった。しかしながら、今回選択した light green および metanil yellow から腫瘍実質・間質について得られる情報は乏しいものであった。CD34はグリコシル化した膜貫通型タンパク質であり細胞膜が染色される。対比染色に用いる溶液によっては、組織の挫滅やスライドガラスからの組織片の剥がれなどで生じる組織片の亀裂などの artifact と脈管の鑑別がなお困難となり、外科病理のルーチンワークで行うにはあまり適さないとと思われる。また、同一切片上で、CD34と elastica 染色による2重染色で脈管侵襲の判定を行った報告があるが、1か所でもリンパ管侵襲および脈管侵襲を認めた場合に陽性、まったく認めない場合を陰性とすることを基準とした場合、ly と v は予後因子としてはリンパ節転移を凌駕しえない因子であるが、4個以上の静脈侵襲所見にはリンパ節転移とは独立性を有する臨床意義があるとしている¹⁰⁾。今回、CD34免疫染色と種々の対比染色を行い、脈管について観察を行った。同一標本上での反対

色による詳細な脈管の同定は、脈管侵襲の病理医間による判定の相違や、標本作製に際し複数枚を作製することで発生する組織像の相違の軽減につながり、このことが患者の予後に大いに関わると考えられる。ただし、反対色の追及のみに従事してしまうと、核や細胞質、細胞膜の染色がもう一方の染色によって不明瞭になり脈管の判定が困難になるため、さらなる検討が必要であると思われる。

稿を終えるにあたり、その機会と格別なるご指導ご鞭撻を頂いた日本大学歯学部病理学講座浅野正岳教授に謹んで感謝申し上げます。なお、本論文に関して開示すべき利益相反はありません。

文献

- 1) Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62, 10-29.
- 2) Ganly I, Patel S, Shah J (2012) Early stage squamous cell cancer of the oral tongue-clinicopathologic features affecting outcome. *Cancer* 118, 101-111.
- 3) Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R (2011) Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23, 633-641.
- 4) American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2016. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>. (2017年11月27日アクセス).
- 5) 坂本穆彦(2015)癌の拡がり方と進行度. 標準病理学. 第5版, 北川昌伸, 仁木利郎, 医学書院, 東京, 259-261.
- 6) 日本口腔腫瘍学会学術委員会「口腔癌取扱い指針」ワーキンググループ(2010)原発集. 口腔癌取扱い規約. 第1版, 日本口腔腫瘍学会, 金原出版, 東京, 79-80.
- 7) 池上雅博, 劉鉄成, 山下伸子, 羽野寛(2001)大腸sm癌における転移と脈管侵襲との関係および脈管侵襲の病理組織診断上の問題点. *早期大腸癌* 5, 449-457.
- 8) 佐藤 徹(2001)口腔扁平上皮癌の脈管侵襲について-精度の高い検出を目指して-, *口腔腫瘍* 13, 4199-4200.
- 9) 味岡洋一, 渡辺英伸, 西倉 健, 向井 玄, 馬場洋一郎(2003)早期大腸癌の病理組織診断上の問題点, *臨消内科* 18, 343-352.
- 10) 佐藤太一, 神藤英二, 橋口陽二郎, 上野秀樹, 望月秀隆(2006)ss大腸癌症例におけるCD34免疫染色と弾性線維染色の2重染色による脈管侵襲検索の臨床病理学的意義, *日消外会誌* 39, 1571-1576.
- 11) 諏訪 香, 吉田雅行, 金 容壺, 小林 寛, 清水進一, 大月寛郎, 神崎正夫(2009)乳癌における脈管侵襲の臨床的意義, *日臨外会誌* 70, 1262-1270.