

PCNA, MIB-1, p53 蛋白による葉状腫瘍の 悪性度についての検討

長 沼 廣, 森 洋 子*, 高 屋 潔*
酒 井 信 光*, 村 山 晴 喜, 佐 藤 真 一
湯 田 浩 司

はじめに

乳腺腫瘍には上皮性腫瘍, 結合織性及び上皮性混合腫瘍, 非上皮性腫瘍がある。この中で, 結合織性及び上皮性混合腫瘍は線維腺腫, 葉状腫瘍, 若年性肥大症に分類される。線維腺腫は日常に頻繁に遭遇する良性腫瘍であるが, 葉状腫瘍は比較的少なく, 若年性肥大症は稀である。

葉状腫瘍は葉状嚢胞肉腫と呼ばれていたもので, その中には良性, 境界領域病変, 悪性例が含まれる。その悪性度の判定は難しい場合があり, 良

性と判定されたものでも再発する症例も見られる。しかし, 全身転移を起こすような悪性例は少なく, 判定基準も曖昧な部分が残る。今回, 我々は, 葉状腫瘍の悪性度判定について興味ある結果を得たので, 若干の考察を加え, 報告する。

材料及び方法

対象は 1985 年から 1995 年の間に組織的に確定された良性葉状腫瘍 6 例, 良悪性境界葉状腫瘍 1 例, 悪性葉状腫瘍 2 例を用い, 対照症例に 12 例の線維腺腫と非上皮性腫瘍である間質肉腫 1 例を選んだ (表 1)。線維腺腫の中には巨大線維腺腫と葉状腫瘍と鑑別を要した線維腺腫も含まれる。年齢は良性葉状腫瘍が 23 歳~57 歳, 境界領域葉状腫瘍は 44 歳, 悪性葉状腫瘍は 50 歳, 61 歳であった。対照症例の線維腺腫 12 例は 13 歳~56 歳, 間質肉腫は 50 歳の症例であった。

方法は 10% ホルマリン固定後の 3 μ m パラフィン切片を用い, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (DAKO, クローン株 PC 10) および p53 蛋白 (Biomeda) は前処置として一度沸騰させた 0.01 M, pH 6.0 のクエン酸緩衝液に切片を入れ, マイクロウェーブで 3~5 分間 2 回処理してから, 抗体を反応させた。MIB-1 (DAKO) は前処置として切片を蒸留水に入れ, 121°C 10 分間オートクレーブで処理し, 抗体を反応させた。一次抗体反応後, ABC 法による免疫染色を施した。

判定はほとんどの細胞の核が陽性を示すものを 4 (強陽性), かなりの細胞が陽性を示すものを 3 (陽性), 陽性細胞を見るものを 2 (弱陽性), わずかに核が染色されたものを 1 (微弱陽性), 全く染色されないものを 0 (陰性) とした。

表 1. 症例一覧

症例	年齢	組織型
T.Y.	23	葉状腫瘍
K.F.	28	葉状腫瘍
Y.S.	34	葉状腫瘍
A.S.	39	葉状腫瘍
T.Y.	45	葉状腫瘍
E.W.	57	葉状腫瘍
T.H.	44	境界域
N.U.	61	悪性葉状腫瘍
S.Y.	50	悪性葉状腫瘍 (転移)
J.K.	20	巨大線維腺腫
H.S.	40	巨大線維腺腫
T.I.	44	巨大線維腺腫
M.M.	56	巨大線維腺腫
H.S.	17	線維腺腫
N.S.	17	線維腺腫
F.S.	27	線維腺腫
S.S.	32	線維腺腫
E.M.	37	腺維腺腫
M.E.	34	腺維腺腫 (葉状腫瘍様)
Y.M.	13	線維腺腫 (葉状腫瘍様)
T.Y.	18	線維腺腫 (葉状腫瘍様)
T.T.	50	間質肉腫

仙台市立病院病理科

* 同 外科

結 果

病理所見：葉状腫瘍の中で、症例 N.U. は細胞

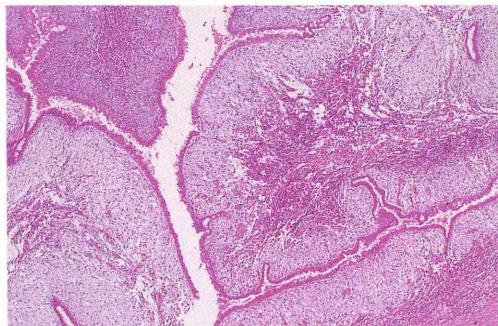


図 1. 症例 N.U. (低悪性度悪性葉状腫瘍) 増殖する腫瘍細胞の細胞密度が高く、核分裂像も見える (HE)

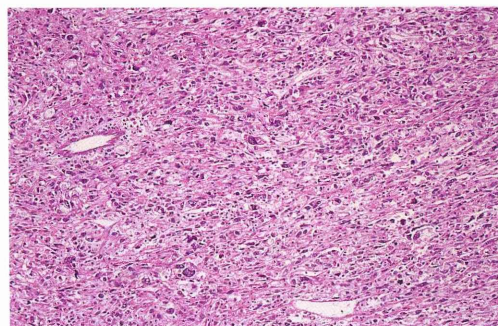


図 2. 症例 S.Y. (高悪性度悪性葉状腫瘍) 核異型の強い腫瘍細胞からなり、多核の腫瘍細胞も散見する (HE)

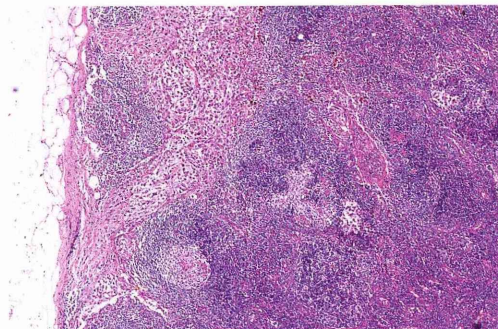


図 3. 症例 S.Y. のリンパ節 リンパ節に異型の強い腫瘍細胞の転移を認める

異型は少ないものの、他の良性群に比して細胞密度が高く、核分裂も目立った(図 1)。症例 S.Y. は間質の腫瘍細胞の異型が強く、多核の腫瘍細胞も多数認められた(図 2)。郭清されたリンパ節に転移を認めた(図 3)。

免疫染色所見：1) PCNA：全例の間質系細胞及び間質肉腫を除いた腫瘍の乳管上皮細胞は強陽性であった(図 4, 図 5)。

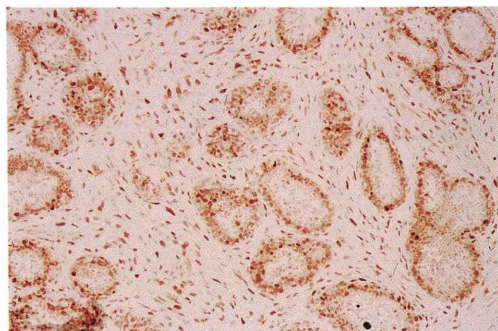


図 4. 良性葉状腫瘍の PCNA 染色像

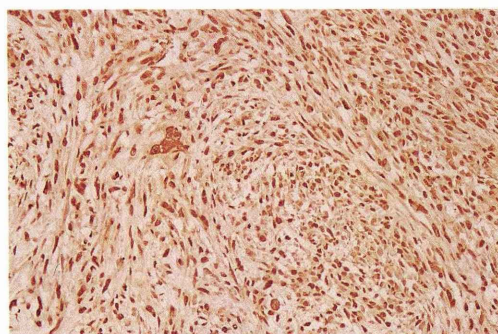


図 5. 悪性葉状腫瘍の PCNA 染色像



図 6. 良性葉状腫瘍の MIB-1 染色像

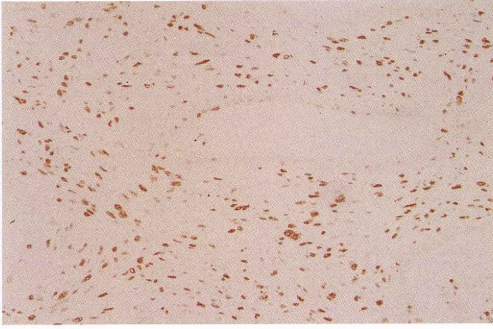


図 7. 症例 N.U. (低悪性度悪性葉状腫瘍) の MIB-1 染色像

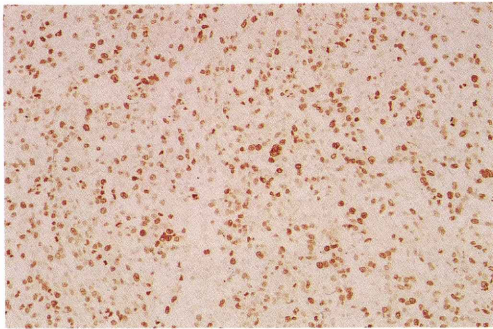


図 8. 症例 S.Y. (高悪性度葉状腫瘍) の MIB-1 染色像



図 9. 症例 S.Y. (高悪性度葉状腫瘍) の p53 蛋白染色像

2) MIB-1: 全例の乳管上皮細胞は弱～中程度の陽性を示したが、線維腺腫、良性葉状腫瘍の間葉系細胞はほぼ陰性であった(図 6)。境界領域葉状腫瘍、悪性葉状腫瘍、間質肉腫の 4 例腫瘍細胞は弱～中程度の陽性であった(図 7, 図 8)。

3) p53 蛋白: 間質肉腫を除いた全例の乳管上皮細胞, 20 例の間葉系細胞は陰性～弱陽性で、転移を示した悪性葉状腫瘍の 1 例のみが強陽性を示した(図 9)。

表 2 に全症例の染色結果を示すが, PCNA は症例, 良悪性間でほとんど差を認めず, MIB-1 が悪性群で陽性例が目立った。しかし, 良性群の中にも陽性を示す症例もあり, 特に大きな差はなかった。p53 は弱陽性の症例は良性群においても認められたが, 症例 S.Y. は強陽性像を示し, 他の症例と大きな違いを示した。

考 察

本腫瘍は以前は葉状囊胞肉腫と呼ばれており, 良悪性の鑑別が難しいことから一括呼称として葉状腫瘍とされた¹⁾。葉状腫瘍は良性乳腺疾患の 0.5～7% を占め²⁻⁶⁾, 悪性の葉状腫瘍は葉状腫瘍の約 6% を占める³⁾。年齢的には 40 歳代に最も多い³⁾。我々が検討した症例の平均年齢は 44 歳で, 良性群は 38 歳, 悪性群は 52 歳で, 悪性群に高齢者が多かった。葉状腫瘍の良悪性は細胞密度, 細胞異型, 核分裂数などで判断するが⁷⁻⁹⁾, 良性と判定されたものでも再発することがある。この場合の多くは取り残し再発と考えられているが, 細胞学的には再発を予想することは難しい。

今回, 我々は組織学的には低悪性度の悪性葉状腫瘍と診断され, 局所再発を頻回に繰り返す症例と, 来院時からリンパ節転移, 遠隔転移を認めた悪性葉状腫瘍を経験し, その違いを探る目的で, 増殖因子や癌遺伝子の検索を試みた。

前述のごとく本腫瘍の組織学的な良悪性の判定は難しく, EI-Naggar ら¹⁰⁾ は DNA ploidy の検索で良悪性の間に差を認め, Murad¹¹⁾ は DNA ploidy と S-phase proliferating index の併用で良悪性の鑑別に有効であると報告したが, 土屋ら¹²⁾ はこれらの検討では差を認めないと報告している。即ち, 組織学的鑑別, DNA 分析などだけでは鑑別が難しいことが分かり, 我々は種々の増殖因子, 癌遺伝子を免疫染色的に検討した。

増殖因子である PCNA は polymerase delta accessory protein で, S 期の細胞の核を反応す

表 2. PCNA, MIB-1, p53 蛋白 免疫染色結果

症例	年齢	診断	PCNA		MIB-1		p53	
			上皮	間質	上皮	間質	上皮	間質
T.Y.	23	葉状腫瘍	3	2	2	2	1	0
K.F.	28	葉状腫瘍	3	3	2	0	0	0
Y.S.	34	葉状腫瘍	4	3	2	0	2	2
A.S.	39	葉状腫瘍	4	3	2	1	2	0
T.Y.	45	葉状腫瘍	4	3	2	0	0	2
E.W.	57	葉状腫瘍	4	2	2	2	2	0
平均	38		3.67	2.67	2	0.8	1.2	0.7
T.H.	44	境界域	3	3	2	2	0	1
N.U.	61	悪性葉状腫瘍	4	4	2	3	1	1
S.Y.	50	悪性葉状腫瘍 (転移)		4		4		4
J.K.	20	巨大線維腺腫	4	2	2	0	0	0
H.S.	40	巨大線維腺腫	4	2	2	0	2	2
T.I.	44	巨大線維腺腫	4	3	2	2	0	0
M.M.	56	巨大線維腺腫	4	3	0	2	2	0
平均	40		4	2.5	1.5	1	1	0.5
H.S.	17	線維腺腫	3	3	2	0	0	0
N.S.	17	線維腺腫	3	3	2	0	0	1
F.S.	27	線維腺腫	4	2	2	2	1	0
S.S.	32	線維腺腫	3	3	2	0	0	1
E.M.	37	線維腺腫	3	3	2	2	0	1
平均	26		3.2	2.8	2	0.4	0.2	0.6
M.E.	34	線維腺腫 (葉状腫瘍様)	3	3	1	0	0	0
Y.M.	13	線維腺腫 (葉状腫瘍様)	2	2	2	0	0	0
T.Y.	18	線維腺腫 (葉状腫瘍様)	4	2	2	0	2	2
平均	22		3	2.33	1.67	0	0.7	0.7
T.T.	50	間質肉腫		3		2		1

る¹³⁾。今回の症例においても乳管上皮細胞はほぼ全例強陽性を示し、かつ間質細胞も強い陽性像を示した。このことから、上皮性及び結合組織混合腫瘍は乳管上皮および間質細胞も盛んに増殖していることが窺える。線維腺腫の中でも急速に大きくなる例は間質細胞の増殖が強いと推察されるが、今回検討した症例の中では、巨大線維腺腫と通常の線維腺腫との間には大きな差は認めなかった。これに対して葉状腫瘍は間質細胞の腫瘍性増殖が主体であることが、上皮成分、間質成分ともにPCNAの染色性が強陽性であることから裏付けられる。しかし、良悪性群間において染色性には

ほとんど差を認めないことから、増殖性細胞であるか否かを判定するのに有効であるが、悪性度の指標にはなりにくいことが判る。

PCNAと同様に増殖因子¹⁴⁾であるMIB-1はKi-67核抗原に反応し、G1, S, G2, M期の細胞の核内に見られる。良悪性の指標になりうる因子として、多くの研究がなされている^{15~17)}。悪性腫瘍の予後因子としてのlabeling indexに予後良好の群と不良群の間に差を認めているが¹⁷⁾、良悪性の診断の決定的証拠にはなりにくい。即ち、本検討でも良悪性群の腫瘍内の乳管上皮はいずれの症例においても陽性像を示し、乳管上皮の良悪性の判

断は難しいことが判った。しかし間質細胞に関しては、境界領域と間質肉腫を含む悪性群において陽性像が目立った。特に臨床的にも明らかな悪性と判定された2症例では強陽性を示し、悪性所見の一因子として取り上げられた。即ち、間質系細胞の腫瘍に関してはMIB-1は良悪性の鑑別に有用である可能性が示唆された。

p53蛋白は癌抑制遺伝子の異常産物と考えられ¹⁸⁾、本蛋白も悪性の指標として多くの腫瘍で検討されている¹⁹⁻²¹⁾。Kimらは良性と悪性の葉状腫瘍の間に大きな差を認め、悪性の指標と成りうると報告している²²⁾。今回の検討において、良性腫瘍群と低悪性度腫瘍群(症例TH, NU, TT)では大きな差を認めなかった。ところが、転移を認めた高度悪性葉状腫瘍は強陽性像を示したことから、悪性群においてもより悪性度の高いものの指標になると考えられた。他の癌、たとえば甲状腺癌などでは癌全体の陽性率は高くないものの、癌先進部では陽性率が高くなり、悪性度の評価には適している²³⁾。今回の検討でも、局所再発を繰り返す悪性葉状腫瘍と遠隔転移を認めた悪性葉状腫瘍では、組織像の異型度に伴い陽性度が大きく異なった。

以上の如く、増殖因子、癌遺伝子を単独で用いて、良悪性の指標にするとかえってその鑑別が困難である場合が多い。今回の検討ではいずれの因子を用いても上皮系の細胞の良悪性の鑑別は難しいことがわかったが、間質系の細胞の良悪性についてはMIB-1, p53蛋白が有用であることが示唆された。また、悪性群の中でも転移を起こすような悪性度の高いものではp53蛋白が強陽性を示し、高度悪性の裏付けをするものと考えられた。

おわりに

組織学的に良悪性の鑑別が難しい葉状腫瘍の悪性度について増殖因子、癌遺伝子を用いて検討した。それぞれの増殖因子、癌遺伝子の検討を組み合わせることにより、良性、境界領域、低悪性、高悪性などを鑑別できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 乳癌研究会 編: 臨床, 病理 乳癌取り扱い規約 金原出版, 東京, 1986
- 2) 長谷部孝裕 他: 良性乳腺疾患の病理 病理と臨床 **7**: 440-448, 1989
- 3) Dyer NH et al: Cystosarcoma phyllodes. Br J Surg **53**: 450-455, 1966
- 4) Reddick RL et al: Stromal proliferations of the breast: an ultrastructural and immunohistochemical evaluation of cystosarcoma phyllodes, juvenile fibroadenoma, and fibroadenoma. Hum Pathol **18**: 45-49, 1987
- 5) Pietruszka M et al: Cystosarcoma phyllodes: a clinicopathological analysis of 42 cases. Cancer **41**: 1974-1983, 1978
- 6) Auger M et al: Cystosarcoma phyllodes of the breast and its mimics. An immunohistochemical and ultrastructural study. Arch Pathol Lab Med **113**: 1231-1235, 1989
- 7) Norris HY et al: Relationship of histological features to behavior of cystosarcoma phyllodes: Analysis of ninety-four cases. Cancer **20**: 2090-2099, 1967
- 8) Azzopardi JG: Problems in Breast Pathology. London: Saunders, 1979: 346-378
- 9) Cohn-Cedermark G et al: Prognostic factors in cystosarcoma phyllodes. Cancer **68**: 2017-2022, 1991
- 10) El-Naggar AK et al: DNA content and proliferative activity of cystosarcoma phyllodes of the breast. Potential prognostic significance. Am J Clin Pathol **93**: 480-485, 1990
- 11) Murad TM et al: Histopathological and clinical correlations of cystosarcoma phyllodes. Arch Pathol Lab Med **112**: 752-756, 1988
- 12) 土屋敦雄 他: 乳腺悪性葉状腫瘍における病理組織学的所見と核DNA量の関連 病理と臨床 **11**: 215-220, 1993
- 13) Robbins BA et al: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med **111**: 841-845, 1987
- 14) Brown DC et al: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. Histopathology **17**: 489-503, 1990

- 15) Tungekar MF et al: Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology* **19**: 545-550, 1991
- 16) Wintzer H et al: Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* **67**: 421-428, 1991
- 17) Gerdes J: Ki-67 and other proliferating markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluation in human malignancies. *Cancer Biology* **1**: 199-206, 1990
- 18) Vojtesek B et al: An immunochemical analysis of human nuclear phosphoprotein p53: new monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Meth* **151**: 237-244, 1992
- 19) Cattoretti G et al: p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* **41**: 178-783, 1988
- 20) Poeter PL et al: Wide spread p53 expression in human malignant tumors. An immunohistochemical study using metharcanfixed paraffin embedded tissue. *Am J Pathol* **140**: 145-153, 1992
- 21) van den Berg FM et al: Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *J Pathol* **157**: 193-199, 1989
- 22) Kim CJ et al: Patterns of p53 expression in phyllodes tumors of the breast. *J Korean Med Sci* **8**: 325-328, 1993
- 23) 陳 瑞新他: 甲状腺癌における p53 蛋白の過剰発現 東北大学医療技術短期大学部紀要 **3**: 107-112, 1994