

## 乳癌におけるホルモンリセプターと脈管系マーカーの 免疫二重染色の検討

長 沼 廣, 佐 藤 真 一, 湯 田 浩 司  
 原 田 雄 功\*, 大 江 大\*, 高 屋 潔\*

### はじめに

乳癌の診断および治療技術がここ数十年で進歩したことで、乳癌の病理学的特徴についての詳細な研究に対する関心が高まっている。化学療法やホルモン療法などの補助療法は手術可能な乳癌に対し有効であることが明らかにされ、再発の危険性を正確に示す癌の特徴、あるいはその組み合わせを把握しておくことは極めて重要である。したがって、乳癌の病理学的検査を行うことにより、癌の組織学的異型度(grade)および組織型サブタイプ、その他の予後診断や経過予測のための指標など、詳細な情報が得られることが期待されて来た<sup>1-6)</sup>。2005年、スイスのSt. Gallenで開催された第9回国際早期乳癌治療学会ではリスク分類のため、病理学的腫瘍径、核グレード分類、腫瘍周辺の脈管侵襲、HER2、年齢が重要な項目として取り上げられた<sup>7)</sup>。更に2007年にはホルモンリセプターの発現の有無が項目に追加された。これらの因子の中で、脈管侵襲が重視されているが、HE染色上脈管侵襲の有無の判定は難しい。リンパ管及び血管内皮マーカーの免疫染色による判定が望

まれているものの、依然としてHE染色での判定に委ねられている。今回我々はほぼルーチン化しているホルモンリセプター(HR)免疫染色に脈管マーカーを二重免疫染色することを試み、この染色をルーチン化出来るかどうかの検討を行ったので報告する。

### 対象・方法

対象は平成18年10月～平成19年3月の間に当院で手術された乳癌症例で、浸潤性乳癌39例を

表2. 本検討に用いた二重免疫染色の方法

1. 脱パラ
2. 水洗せずに室温にて20分間0.3%過酸化水素水加メタノールで内因性のペルオキシダーゼをブロックする。
3. 流水で水洗する。
4. 蒸留水で水洗する。
5. PBSにてよく洗浄する。
6. 二次抗体の免疫動物に合わせた正常血清と室温で20分間反応させる。
7. PBSにて洗浄する。
8. 一次抗体としてER抗体とD2-40抗体をそれぞれ100μlずつ、又はPgR抗体とCD34抗体をそれぞれ100μlずつ切片に乗せ、4℃で8～16時間反応させる。
9. PBSにて十分に洗浄する。
10. 室温にて30分間ビオチン化二次抗体を反応させる。
11. PBSにて十分に洗浄する。
12. DABまたはAECにて発色する。
13. 10分間流水にて発色剤の色出しをする。
14. ヘマトキシリンにて核染する。
15. キシレン系封入剤にて封入する。

表1. 使用抗体一覧

抗原	抗体	希釈率
Estrogen receptor	NCL-PGR-1A6	1:50
Progesteron receptor	NCL-ER-6F11	1:200
CD34	NU-4A1	1:1
D2-40	D2-40	1:1

仙台市立病院病理科  
 \*同 外科

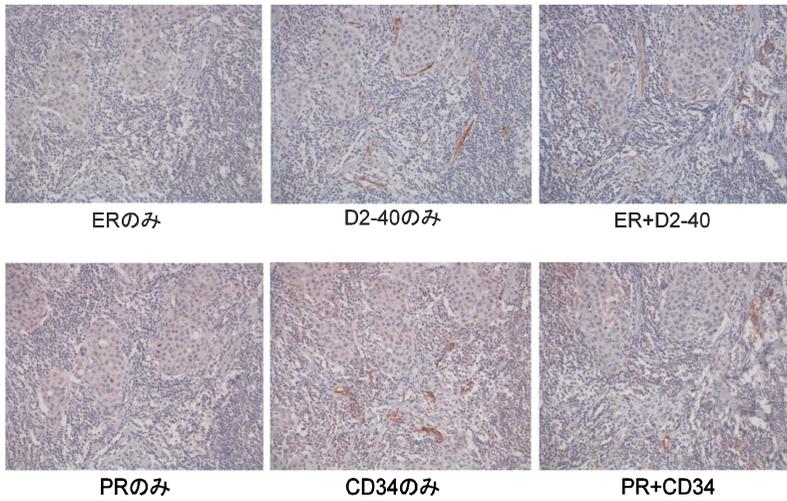


図1. ホルモンリセプター陰性例におけるホルモンリセプターの免疫染色及び脈管系マーカーの2重染色の比較: 左 ER, PR は陰性, 中央 リンパ管, 血管はそれぞれ陽性, 右 ER, PR は陰性で, 脈管は陽性で, 核には全く陽性像を認めない。

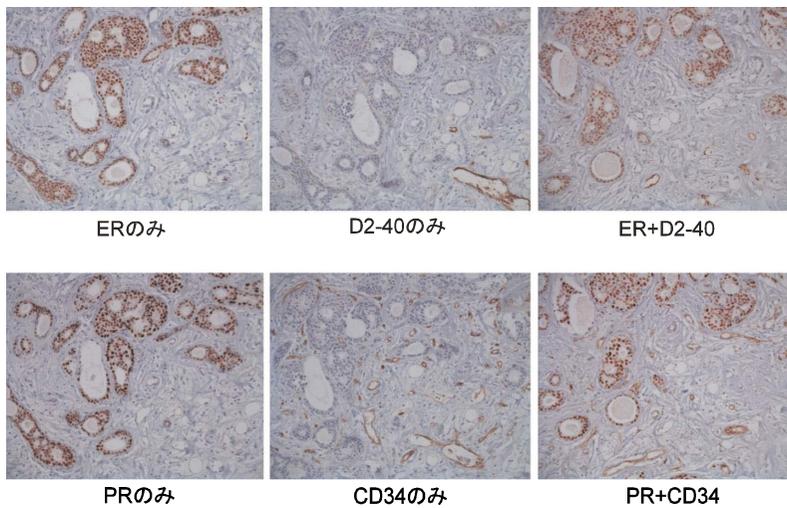


図2. ホルモンリセプター陽性例におけるホルモンリセプターの免疫染色及び脈管系マーカーの2重染色の比較: 左 ER, PR は陽性, 中央 リンパ管, 血管はそれぞれ陽性, 右 ER, PR は陽性で, 脈管も陽性で, 核の陰性化や強陽性像は認めない。

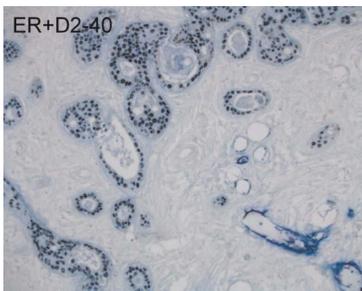


図3. 発色剤が異なるERとD2-40の二重染色像  
リンパ管の輪郭がはっきりしない。

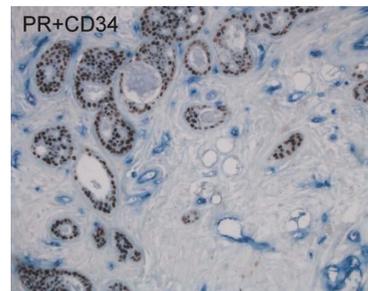


図4. 発色剤が異なるPRとCD34の二重染色像  
血管の輪郭がはっきりしない。

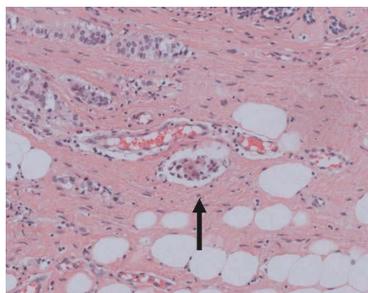


図5. 脈管侵襲像 (HE 染色) ↑部に明らかな脈管侵襲を認めるが、リンパ管か血管かの判断はむずかしい。

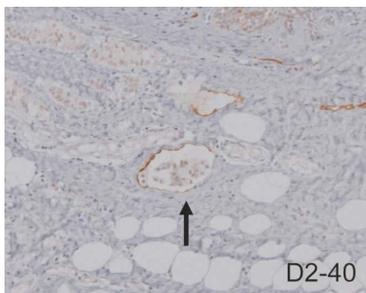


図6. 脈管侵襲の D2-40 免疫染色像 脈管侵襲部に一致して D2-40 陽性で、リンパ管侵襲であることが明らかである。

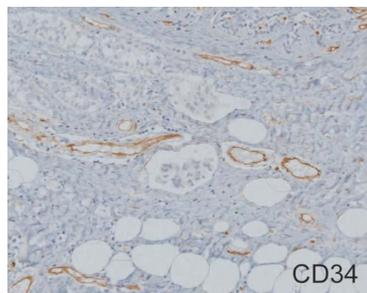


図7. 脈管侵襲の CD34 免疫染色像 脈管侵襲部は陰性で、周囲の血管がはっきり陽性像を示している。脈管侵襲は静脈侵襲でないことが明らかである。

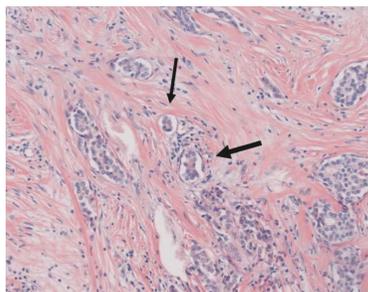


図8. 脈管侵襲が疑われる像 (HE 染色) 脈管侵襲を疑う像を認める (↑)。

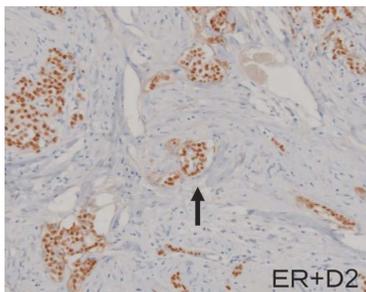


図9. 脈管侵襲を疑う部の D2-40 免疫染色像 脈管侵襲部は D2-40 陰性で (↑)、リンパ管侵襲ではないことが明らかである。

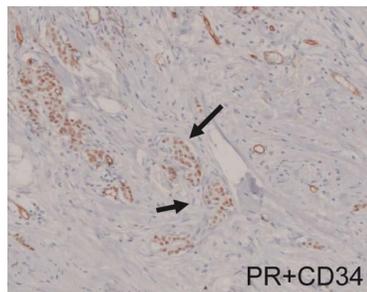


図10. 脈管侵襲を疑う部の CD34 免疫染色像 脈管侵襲部は CD34 陰性で (↑)、静脈侵襲でないことが明らかである。

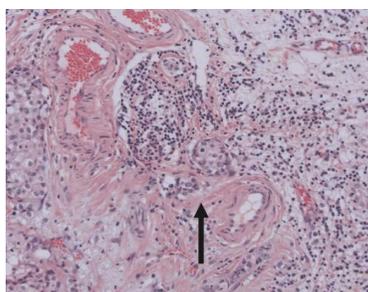


図11. 脈管侵襲とは判断できない癌浸潤部 (HE 染色) 太い血管の周囲に癌の浸潤があるが (↑)、脈管侵襲かどうかは不明である。

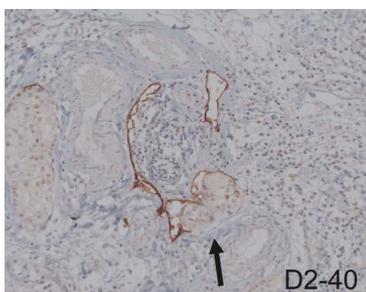


図12. 図11の D2-40 免疫染色像 血管周囲に D2-40 陽性のリンパ管が見られ (↑)、その中に癌が侵襲している像を認める。

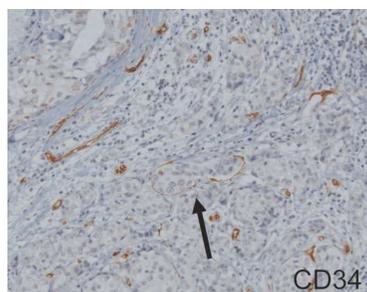


図13. 乳癌浸潤部の CD34 免疫染色像 浸潤する癌の間に CD34 陽性の毛細管を多数認めるが、一部は癌を取り囲み (↑)、静脈侵襲と考えられる。

表 3. 通常の二重染色方法

1. 脱パラ
2. 水洗せずに室温にて 20 分間 0.3% 過酸化水素水加メタノールで内因性のペルオキシダーゼをブロックする。
3. 流水で水洗する。
4. 蒸留水で水洗する。
5. PBS にてよく洗浄する。
6. 二次抗体の免疫動物に合わせた正常血清と室温で 20 分間反応させる。
7. PBS にて洗浄する。
8. 一次抗体として ER 抗体又は PgR 抗体 100  $\mu$ l を 4°C で、8~16 時間反応させる。
9. PBS にて洗浄する。
10. ビオチン化ペルオキシダーゼ二次抗体と室温で 30 分間反応させる。
11. PBS にて洗浄する。
12. DAB にて発色する。
13. 10 分間流水にて DAB の色出しをする。
14. PBS にて洗浄する。
15. 一次抗体として D2-40 抗体、或いは CD34 抗体 100  $\mu$ l を 4°C で、8~16 時間反応させる。
16. PBS にて洗浄する。
17. 室温にて 30 分間ビオチン化アルカリフォスファターゼ二次抗体 (ABC-AP キット) を反応させる。
18. Vecter Blue にて発色
19. 10 分間流水にて色出しする。
20. メチルグリーンにて核染する。
21. 水溶性封入剤にて封入する。

用いた。術後 48 時間以内にホルマリン固定された乳腺の主腫瘍のパラフィン切片 1 枚ずつを使用した。日常的に検査されているホルモンリセプターであるエストロゲン・リセプター (ER) 免疫染色にリンパ管マーカー (D2-40) を、プロジェステロン・リセプター (PgR) 免疫染色に血管内皮マーカー (CD34) の二重免疫染色を行った。使用した抗体の詳細は表 1 に示した。本検討のための二重染色方法は表 2 の手順で行った。ホルモンリセプターは核に、脈管は内皮に免疫染色陽性像を示すため、発色剤は同一のものを使用した。また、異なった発色剤を用いる通常の二重染色法を表 3 の手順で行い、染色状態を比較検討した。

## 結 果

対象症例 39 例 (31 歳~89 歳) 中で、1) 35 歳未満 1 例, 35 歳以上 38 例, 2) T1 以下 24 例, T2 以上 15 例, 3) リンパ節転移なし群は 24 例, リンパ節転移あり群は 15 例であった。3) リンパ節転移なし群 24 例の中で (1) リンパ管侵襲なし, 静脈侵襲なしは 20 例, (2) リンパ管侵襲あり, 静脈侵襲なしは 2 例, (3) リンパ管侵襲, 静脈侵襲共にありは 2 例であった。リスク分類をすると低リスク群 12 例, 中間リスクでリンパ節転移なし群 12 例, 中間リスクでリンパ節転移あり群 8 例, 高リスク群 7 例であった。なお, 31 歳の例は, T1c, ly0, v0, pN0, G3, ER 陰性, PgR 陰性, HER2 陽性であった。

表 1, 表 2 で比較されるように染色技術上, 本検討で行った二重染色は比較的簡便で, かつ HR 検索と別々に染色するよりはかなり労力を軽減できた。

ホルモンリセプター抗体単独の免疫染色, 脈管系マーカー単独の免疫染色, 2 種類の抗体を施した免疫染色を比較してみると同一切片に 2 種類の抗体を施しても, それぞれの免疫反応に影響を及ぼすことはほとんどないことが確認された (図 1, 2)。すなわち, ホルモンリセプター陰性例が脈管系マーカーの 2 重染色で核の陽性所見が出ることはなく, ホルモンリセプター陽性例が脈管系マーカーの 2 重染色で陰性化またはより強く陽性化することはないことが確認された。更にホルモンリセプターの免疫染色に二重染色された D2-40 陽性のリンパ管と CD34 陽性の静脈との区別は明瞭であった (図 3, 4)。これに対して通常の二重染色法で行った結果は核陽性像が黒色に, 脈管は青色に染色されたが, 水溶性封入剤を使っているため, 脈管の輪郭がぼやけ, 脈管侵襲の有無を判定するには不十分な状態であった (図 5, 6)。

HE 染色上で脈管侵襲が疑われた症例で, 明確にリンパ管侵襲か静脈侵襲かが確認できた症例が多数認められた (図 7, 8)。逆に HE 染色上, リンパ管侵襲が疑われたが, D2-40 免疫染色ではリンパ管ではないことが判明した症例も見られた (図

9).

腫瘍内部では脈管侵襲が非常にわかりにくい  
が、脈管系マーカーの免疫染色にてリンパ管侵襲  
や静脈侵襲を発見できた症例も認めた (図 10,  
11).

## 考 察

欧米に比べて日本人の乳癌は少ないとは言え、  
日本でも乳癌患者は年々増加している。治療は外  
科の手術が基本であるが、術後療法として放射線  
療法、化学療法、ホルモン療法が加えられる。最  
近は、個々の患者の乳癌が内分泌反応性の程度に  
よって、内分泌療法と化学療法の効果が異なるこ  
とから、その効果的な使い分けを図ることが術後  
療法の基本的な主旨となっている<sup>8)</sup>。このため、内  
分泌反応性の患者に対しては内分泌療法が大前提  
の治療となり、内分泌非反応性の患者には化学療  
法のみを用いる。その中間にある内分泌反応性不  
確実な患者は、ホルモンレセプターの発現は認め

るが、内分泌療法単独での治療効果に限界がある  
ことから、原則として内分泌療法と化学療法の併  
用を考慮することになる。したがって、乳癌の病  
理的検査を行うことにより、癌の組織学的異型  
度(grade)および組織型サブタイプ、その他の予  
後診断や経過予測のための指標など、詳細な情報  
が得られることが期待されて来た。増加する乳癌  
の治療方針を決定する上で重要な因子をはっきり  
する目的で、2005年1月にスイスのSt. Gallen  
(ザンクト・ガレン)で開かれた第9回 Internation  
al Conference on Primary Therapy of Early  
Breast Cancerにて表4に示すコンセンサスレ  
ポートが報告された<sup>1)</sup>。コンセンサスレポートの  
内容は、これまでのコンセンサスと比べて内分泌  
反応性(内分泌療法への反応性)がさらに重要視  
された内容になっていることが特徴で、内分泌反  
応性の評価を行った上で、個別化治療を行うこと  
が強調されている。また、これに加え、リスクカ  
テゴリ、治療指針も大幅に改訂された。この中  
に病理学的評価が重要な項目としてあげられてい  
る。

St. Gallen 2005のコンセンサスレポートでは  
リスク分類のため、病理学的腫瘍径、核グレード  
分類、腫瘍周辺の脈管侵襲、HER2、年齢が重要な  
項目として取り上げられた<sup>1)</sup>。本研究では「腫瘍周  
辺の脈管侵襲」に関して検討を行った。コンセン  
サスレポートの中では「脈管浸潤」という表現に  
なっており、ここでいう脈管には血管も含まれる  
が、特にリンパ管浸潤のことを指している。リン  
パ節転移がない例を低リスク群と中間リスク群に  
分ける因子として新たに追加されている。St. Gal  
len 2007では低リスク群は広範な脈管侵襲がない  
という項目に変更され、更に中間及び高リスク群  
ではER、PgRの発現の有無が項目に追加された。

ほぼルーチン化しているホルモンレセプターの  
免疫染色は保険点数も認められているが、St. Gal  
len 2005ではリスク因子に含まれていなかった。  
St. Gallen 2007においてこの検査がリスク分類  
に取り上げられたことは今後の検査施行意義にお  
いて重要になる。コンセンサスレポートには、ホル  
モンレセプターの検索に免疫組織学的手法、あ

表4. リスクカテゴリー分類

(1) 低リスク群
腋窩リンパ節転移陰性で、以下の項目を全て満たすもの:
① 病理学的腫瘍径 (pT) ≤ 2 cm
② 核グレード 1
③ 腫瘍周囲の脈管浸潤がない
④ HER2/neu の過剰発現・遺伝子増幅がない
⑤ 年齢 ≥ 35 歳
(2) 中間リスク群
腋窩リンパ節転移陰性で、以下の項目が1つでも該当するもの:
① 病理学的腫瘍径 (pT) > 2 cm
② 核グレード 2~3
③ 腫瘍周囲の脈管浸潤を伴う
④ HER2/neu の過剰発現・遺伝子増幅を伴う
⑤ 年齢 < 35 歳
⑥ 腋窩リンパ節転移 1~3 個陽性で、HER2/neu の過剰発現・遺伝子増幅がない
(3) 高リスク群
① 腋窩リンパ節転移 1~3 個陽性で、HER2/neu の過剰発現・遺伝子増幅を伴う
② 腋窩リンパ節転移 4 個以上陽性

るいは生化学的手法を用いて正確に判定すると記載されている。日本ではホルモンレセプターの判定に、これまで生化学的な酵素免疫測定 (enzyme immunoassay; EIA) が用いられていたが、EIA 測定キットが発売中止となったことから、免疫組織化学 (immunohistochemistry) 法で組織染色し、陽性細胞を判定する方法に全て移行している。従って、ホルモンレセプターの免疫染色がほぼ全例の乳癌に施行されることになる。

病理学的悪性度判定の中で、リンパ節転移陽性群は HE 染色のみで判定可能だが、低及び中間リスク群の中で脈管侵襲の有無を問われる症例に関しては HE 染色のみでは判定が難しく、脈管系マーカーの免疫染色が望まれる。1990年に血液マーカーである CD34 が血管内皮の良いマーカーであることが報告され<sup>9,10</sup>、1998年に D2-40 がリンパ管内皮マーカーとして報告された<sup>11</sup>。これらの脈管マーカーが出現してから、血管系腫瘍の良いマーカーであると同時に血管とリンパ管の区別、静脈侵襲、リンパ管侵襲の詳細が分かるようになって来た。乳癌における脈管侵襲の同定の為に脈管系マーカーの免疫染色が当然望まれる。しかし、ホルモンレセプター及び HER2 検査がルーチン化しているので、更なる追加検査をルーチン化するのは一般業務の中では難しい。そこでわれわれはルーチン化し、かつ重要な検査項目として取り上げられているホルモンレセプターの免疫染色に脈管系マーカーを二重染色することで、染色操作を簡略化し、ルーチン化が可能かどうかを検討した。

以前から様々な手法で、同一組織内の異種抗原に対する二重染色が行われていた<sup>12</sup>が、操作が煩雑であることや染色状態があまり良くないため、一般化していなかった。最近、同一組織における多種抗原発現の検索に二重染色の有用性が報告され始めている<sup>13</sup>。同定する異種の抗原が細胞の同じような部位に染色される場合は発色する色を変えないと2種類の抗原を判別出来ない。これに対して、ホルモンレセプターは核に陽性になり、脈管系マーカーは脈管腔壁に陽性になるため、同色で染色しても判別に困ることはない。今回の検討

ではそれぞれの抗体が染色状態に影響することはなく、かつ脈管の同定が容易であることから、本二重染色はホルモンレセプターの有無、脈管侵襲の有無を同一切片上で行うことが出来る良い方法であると考えられた。

検討した症例を見てみると脈管侵襲の有無がリスク分類上必要な症例が24例と半数以上で、脈管系マーカーの免疫染色が必要な症例が多い事が分かった。乳癌症例は核グレード分類、ホルモンレセプターの免疫染色、HER2の免疫染色、温存による全割切片検索、病変のマッピングなど様々な情報を提供しなければならず、脈管侵襲を判定するための免疫染色をルーチン化するには病理検査を行う側にとっては抵抗がある。この状況の中で、効率的に検索を進める上で、本二重染色法は有用と考えられる。今後、リスク分類及びホルモンレセプター、HER2の発現によるきめ細かな治療が選択される時代を迎え、病理検査も各種の要望に対応せざるを得ない。しかし、厳しい医療情勢の中で、経済効率、医療効率を考えながら技術改新をする必要もある。本検査法が患者さんの治療に役立つことを期待している。

## 文 献

- 1) Connolly JL et al: Recommendations for the reporting of breast carcinoma. *Hum Pathol* **27**: 220-224, 1996
- 2) Haybittle JL et al: A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* **45**: 361-366, 1982
- 3) Balslev I, Axelsson CK, Zedelev K et al: The Nottingham Prognostic Index applied to 9,149 patients from the studies of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG). *Breast Cancer Res Treat* **32**: 281-290, 1994
- 4) Pinder SE et al: The importance of histological grade in invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer* **83**: 1529-1539, 1998
- 5) Sundquist M et al: Applying the Nottingham Prognostic Index to a Swedish breast cancer population. *South East Swedish Breast Cancer Study Group. Breast Cancer Res Treat*

- 53**: 1-8, 1999
- 6) D'Eredita G et al: Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer* **37**: 591-596, 2001
  - 7) Goldhirsch A et al: Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* **16**: 1569-1583, 2005
  - 8) Narayanan S et al: Adjuvant systemic therapy for operable breast cancer. *Surgeon* **5**: 101-106, 2007
  - 9) Schlingemann RO et al: Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest* **62**: 690-696, 1990
  - 10) Fina L et al: Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* **75**: 2417-2426, 1990
  - 11) Kahn HJ et al: Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* **15**: 434-440, 2002
  - 12) Gown AM et al: Avidin-biotin-immunoglucose oxidase: use in single and double labeling procedures. *J Histochem Cytochem* **34**: 403-409, 1986
  - 13) 中村直哉 他: CD10 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の検討. *Journal of The Japanese Society of Lymphoreticular Tissue Research* **46**: 81, 2006