Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Usefulness of Immunocytochemistry Using a Breast Marker Antibody Cocktail Targeting P63/cytokeratin7/18/cytokeratin5/14 for Fine Needle Aspiration of the Breast: a…

Tanaka, Sachi

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2016-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6689号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006689

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

学位論文の内容要旨

Usefulness of Immunocytochemistry Using a Breast Marker Antibody Cocktail Targeting P63/cytokeratin7/18/cytokeratin5/14 for Fine Needle Aspiration of the Breast: a Retrospective Cohort Study of 139 Cases.

乳腺穿刺吸引細胞診における Breast Marker Cocktail 抗体（P63/サイトケラチン 7/18/サイトケラチン 5/14）免疫細胞化学の有用性；139 例の後方視的コホート研究

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
感染病理学
（指導教員：林　祥剛　教授）

田中　幸

【はじめに】
乳腺穿刺吸引細胞診は低侵襲で経済的な検査方法であり乳腺腫瘤の評価方法として広く用いられている．近年，画像技術の進歩やがん検診の重要性への理解が深まっていることから usual ductal hyperplasia や atypical ductal hyperplasia (ADH)，ductal carcinoma in situ (DCIS)などの病変が検出されることが多くなり，それらの細胞診断には苦慮することも多い．市販の Breast marker cocktail: p63/cytokeratin(CK)7/18/CK5/14 は 5 種類の抗体が含まれるカクテル一次抗体である．Breast marker cocktail が乳管内増殖病変の組織学的診断に有用であることは既に発表されているが穿刺吸引細胞診での研究は未だない．　今回われわれは乳腺穿刺吸引細胞診において Breast marker cocktail 免疫細胞化学の有用性をコホート研究により検討したので報告する．
【対象と方法】
2012 年 1 月から 2014 年 3 月に淀川キリスト教病院と茶屋町ブレストクリニックで穿刺吸引細胞診(FNA)を行った 1663 例のうち 148 例に対し淀川キリスト教病院で摘出手術と病理学的診断が行われた．　そのうちの 9 例は検討に充分な細胞量が無かったため除外し 139 例を対象とした．Papanicolaou 染色標本から代表的な範囲を選び細胞転写によりプレパラートを作製した．　CC1 buffer(Ventana Medical Systems) を用い 95℃20 分間の熱賦活を行い，一次抗体として Breast marker cocktail: p63/CK7/18/CK5/14 (Biocare Medical) を用い 30 分間反応させた．二次抗体として MACH2 Double Stain 2 (mouse-HRP, rabbit-AP polymer detection kit; Biocare Medical)で 30 分間反応を行い，発色には betazoid 3,3' diaminobenzidine (DAB; Biocare Medical)を 5 分間反応させた後，warp red (Biocare Medical)を 7 分間反応させた．対比染色としてヘマトキシリンで核染色をした．抗 p63 抗体は mouse monoclonal 抗体であり DAB により核が茶色に発色する．抗 CK5，抗 CK14 抗体も mouse monoclonal 抗体であり DAB により細胞質が茶色に発色する．抗 CK7，抗 CK18 抗体は rabbit monoclonal 抗体であり warp red により細胞質が赤に発色する．細胞集塊の評価として CK5/14 発現細胞が集塊中 20%以上あるものを 'mosaic cluster' とし 20%以下のものを 'monotonous cluster' とした．さらに p63 陽性筋上皮細胞の付着がある集塊は 'cluster with p63' とし無いものは 'cluster without p63' とした．背景の筋上皮細胞については，最も密度が高く出現する部分の高倍率 1 視野あたりの数について計測し，統計学的な有意差を検討した．（$\chi 2$ test, Fisher's test, Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, $P<0.05$）
【結果】
検討した 139 例のうち 29 例で剥がれが生じ残存する集塊が 5 集塊以下となった．また 3 例で免疫細胞化学的な発色が得られなかった．それらを除外し最終

的に107例を検討することが出来た．それらのPapanicolaou染色での細胞診断は良性11例(10.3%)，鑑別困難5例(4.7%)，悪性疑い3例(2.8%)，悪性88例(82.2%)であった．組織学的診断はfibroadenoma 6例(5.6%)，intraductal papilloma 4例(3.7%)，mucocele-like tumor 1例(0.9%)，phyllodes tumor 2例(1.9%,良性1例,境界悪性1例),ADH 3例(2.8%),DCIS 12例(11.2%),lobular carcinoma in situ (LCIS) 1例(0.9%)，invasive carcinoma of no special type 70例(65.4%)，mucinous carcinoma 4例(3.7%)，invasive lobular carcinoma 2例(1.9%)，ductal carcinomaとlobular carcinomaの混在1例(0.9%)，tubular carcinoma 1例(0.9%)であった．今回のカクテル免疫多重染色の「悪性」の指標を‘monotonous cluster without p63’が2集塊以上出現するものとすると，感度97.8%(89/91)，特異度91.7%(11/12)であり元々のPapanicolaou染色での細胞診断の感度94.5% (86/91)，特異度75.0%(9/12)と比較して良好な結果が得られた．‘monotonous cluster with p63’の数は良性，非浸潤癌，浸潤癌の３グループ間に有意差を認めた (P<0.001)．背景の筋上皮細胞の高倍率1視野あたりの数は，fibroepithelial tumors (線維腺腫/葉状腫瘍)でその他の病変より有意に多かった (P<0.001)．

【考察】

今回のわれわれの研究でBreast marker cocktail抗体を用いた免疫細胞化学はPapanicolaou染色での感度，特異度を改善し良好な結果が得られた．

p63は筋上皮細胞マーカーの中で唯一の核内抗原マーカーであり線維芽細胞や血管には発現しない．筋上皮細胞の細胞質は穿刺吸引により機械的破壊を受けやすく細胞質マーカーではfalse negativeを生じるため核内マーカーであるp63は乳腺穿刺吸引細胞診において最も優れた筋上皮細胞マーカーであることがこれまでの研究で明らかにされてきた．またPapanicolaou染色において筋上皮細胞は他の細胞の核が変性したものやアポトーシスの核と鑑別が困難な場合があるためBreast marker cocktailに含まれるp63は乳腺穿刺吸引細胞診の診断精度の向上に貢献するものと考えられた．

Cytokeratins(CKs)については，CK5/6やCK14などのhigh molecular weight cytokeratin(HMWCK)とCK7/18などのlow molecular weight cytokeratin(LMWCK)のモザイク状パターンは良性上皮過形成で見られるのに対しDCISでは見られないことから，乳管内増殖病変における良悪の鑑別についての免疫組織学的な研究は数多くなされてきた．しかしHMWCKとLMWCKの免疫細胞学的な研究は限られたものであった．今回のわれわれの研究でのCKsの染色性もほとんどの症例において免疫組織学的研究で得られたものと同様の染色パターンを示した．しかしながら2パターンの例外を認めた．一つ目はestrogen receptor(-)，progesterone receptor(-)，HER2(-)のtriple negative breast cancerであり，これらは悪性であるのにもかかわらずHMWCKとLMWCKのモザイク状染色の良性パターンを示すことが既に知られている．われわれの研究には3例(2.8%)のtriple negative breast cancerを含み，そのうち2例でmosaic clusters without p63を認めた．この3例全てはhistological grade 3, nuclear grade 3を示し，Papanicolaou染色においても診断は容易であると考える．2つ目の例外パターンは良性例でのアポクリン化生である．われわれの研究では多数のアポクリン化生細胞を含むintraductal papillomaを1例経験した．この症例では良性であるにもかかわらずmonotonous clusters without p63の染色パターンを示した．組織学的にアポクリン化生ではHMWCKの発現を欠くことが既に報告されており，われわれの免疫細胞化学的染色でも同様であった．アポクリン化生においてもPapanicolaou染色で鑑別できる点から，triple negative breast cancer，アポクリン化生の2つの例外パターンは診断に大きな影響を与えないと考える．

この研究ではいくつかの限界も認められた．一つ目は免疫細胞化学的発色が3例(2.8%)で得られなかったことである．この3例の摘出組織のパラフィンブロックでも免疫染色を試みたが染色されなかった．さらに感度の高い染色を検討するべきであると考える．二つ目は細胞の剥がれが生じたことである．non-coating slide glassからcoating slide glassに細胞転写を行ったが改善されない症例があった．免疫細胞化学における細胞の剥がれの多くは，抗原熱賦活中に生じるとされているが，この染色に熱賦活は不可欠である．また厚すぎる細胞塗抹も剥がれの原因となる．positively charged slide glassでの標本作製や液状化細胞診検体を作製することで改善が期待できると考える．

【結語】

この研究はBreast marker cocktail抗体を用いた免疫細胞化学における初のコホート研究であり，乳癌の細胞学的診断において良好な感度，特異度を示した．Breast marker cocktail免疫細胞化学は，従来からのパパニコロウ染色を併用しアポクリン化生などの例外に注意を払えば乳腺穿刺吸引細胞診の診断精度向上に貢献すると考える．

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第２５９１号	氏　名	田中　幸
論文題目 Title of Dissertation	乳腺穿刺吸引細胞診における Breast Marker Cocktail 抗体（P63/サイトケラチン 7/18/サイトケラチン 5/14)免疫細胞化学の有用性；139 例の後方視的コホート研究 Usefulness of Immunocytochemistry Using a Breast Marker Antibody Cocktail Targeting P63/cytokeratin7/18/cytokeratin5/14 for Fine Needle Aspiration of the Breast: a Retrospective Cohort Study of 139 Cases.		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 伊藤智雄 副　査 Vice-examiner 金　陽 副　査 Vice-examiner 鴨志田伸吾		

乳腺穿刺吸引細胞診は低侵襲で経済的な検査方法であり乳腺腫瘤の評価方法として広く用いられている。近年、画像技術の進歩やがん検診の重要性への理解が深まっていることから usual ductal hyperplasia や atypical ductal hyperplasia (ADH)、ductal carcinoma in situ (DCIS)などの病変が検出されることが多くなり、それらの細胞診断には苦慮することも多い。本研究は、乳腺穿刺吸引細胞診において Breast marker cocktail（p63/cytokeratin(CK)7/18/CK5/14）の有用性をコホート研究により検討した。穿刺吸引細胞診(FNA)を行い、摘出手術と病理学的診断を行われた 139 例を対象とした。Papanicolaou 染色標本から細胞転写によりプレパラートを作製した。139 例のうち 29 例で剥がれが生じ、また 3 例で免疫細胞化学的な発色が得られなかった。それらを除外し最終的に 107 例が検討された。それらの Papanicolaou 染色での細胞診断は良性 11 例(10.3%)、鑑別困難 5 例(4.7%)、悪性疑い 3 例(2.8%)、悪性 88 例(82.2%)であった。組織学的診断は fibroadenoma 6 例(5.6%)、intraductal papilloma 4 例(3.7%)、mucocele-like tumor 1 例(0.9%)、phyllodes tumor 2 例(1.9%、良性 1 例、境界悪性 1 例)、ADH 3 例(2.8%)、DCIS 12 例(11.2%)、lobular carcinoma in situ (LCIS) 1 例(0.9%)、invasive carcinoma of no special type 70 例(65.4%)、mucinous carcinoma 4 例(3.7%)、invasive lobular carcinoma 2 例(1.9%)、ductal carcinoma と lobular carcinoma の混在 1 例(0.9%)、tubular carcinoma 1 例(0.9%)であった。カクテル免疫多重染色の「悪性」の指標を‘monotonous cluster without p63’が 2 集塊以上出現するものとすると、感度 97.8%(89/91), 特異度 91.7%(11/12)であり、元々の Papanicolaou 染色での細胞診断の感度 94.5% (86/91)、特異度 75.0%(9/12)と比較して良好な結果が得られた。‘monotonous cluster with p63’の数は良性，非浸潤癌，浸潤癌の 3 グループ間に有意差を認めた（P<0.001)。背景の筋上皮細胞の高倍率 1 視野あたりの数は、fibroepithelial tumors (線維腺腫/葉状腫瘍)でその他の病変より有意に多かった（P<0.001)。 本研究で Breast marker cocktail 抗体を用いた免疫細胞化学は Papanicolaou 染色での感度，特異度を改善し良好な結果が得られた。p63 は筋上皮細胞マーカーの中で唯一の核内抗原マーカーであり線維芽細胞や血管には発現しない。筋上皮細胞の細胞質は穿刺吸引により機械的破壊を受けやすく細胞質マーカーでは false negative を生じるため核内マーカーである p63 は乳腺穿刺吸引細胞診において最も優れた筋上皮細胞マーカーであることがこれまでの研究で明らかにされてきた。また Papanicolaou 染色において筋上皮細胞は他の細胞の核が変性したものやアポトーシスの核と鑑別が困難な場合があるため Breast marker cocktail に含まれる p63 は乳腺穿刺吸引細胞診の診断精度の向上に貢献するものと考えられた。Cytokeratins(CKs)については、CK5/6 や CK14 などの high molecular weight cytokeratin(HMWCK)と CK7/18 などの low molecular weight cytokeratin(LMWCK)のモザイク状パターンは良性上皮過形成で見られるのに対し DCIS では見られないことから、乳管内増殖病変における良悪の鑑別についての免疫組織学的な研究は数多くなされてきた。しかし HMWCK と LMWCK の免疫細胞学的な研究は限られたものであった。本研究での CKs の染色性もほとんどの症例において免疫組織学的研究で

得られたものと同様の染色パターンを示した。しかしながら2パターンの例外を認めた。一つはestrogen receptor(-)、progesterone receptor(-)、HER2(-)のtriple negative breast cancerであり、これらは悪性であるのにもかかわらずHMWCKとLMWCKのモザイク状染色の良性パターンを示すことが既に知られている。本研究には3例(2.8%)のtriple negative breast cancerを含み、そのうち2例でmosaic clusters without p63を認めた。この3例全てはhistological grade 3、nuclear grade 3を示し、Papanicolaou染色においても診断は容易であると考える。他の例外パターンは良性例でのアポクリン化生である。本研究では多数のアポクリン化生細胞を含むintraductal papillomaを1例経験した。この症例では良性であるにもかかわらずmonotonous clusters without p63の染色パターンを示した。組織学的にアポクリン化生ではHMWCKの発現を欠くことが既に報告されており、本研究での免疫細胞化学的染色でも同様であった。アポクリン化生においてもPapanicolaou染色で鑑別できる点から，triple negative breast cancer、アポクリン化生の2つの例外パターンは診断に大きな影響を与えないと考える。この研究ではいくつかの限界も認められた。一つは免疫細胞化学的発色が3例(2.8%)で得られなかったことである。この3例の摘出組織のパラフィンブロックでも免疫染色を試みたが染色されなかった。さらに感度の高い染色を検討するべきであると考える．また、細胞の剥がれが生じたことである。non-coating slide glassからcoating slide glassに細胞転写を行われたが改善されない症例があった。免疫細胞化学における細胞の剥がれの多くは，抗原熱賦活中に生じるとされているが、この染色に熱賦活は不可欠である。厚すぎる細胞塗抹も剥がれの原因となる。positively charged slide glassでの標本作製や液状化細胞診検体を作製することで改善が期待できると考える。

本研究は、乳癌の細胞学的診断において、Breast marker cocktail抗体の有用性について研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかったBreast marker cocktail抗体を用いた免疫細胞化学におけるコホート研究であり，乳癌の細胞学的診断において重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。