

眼瞼悪性腫瘍のケラチン分布に関する免疫組織化学的検索

上原 文行, 大庭 紀雄

鹿児島大学医学部眼科学教室

要 約

眼瞼悪性腫瘍組織における細胞間相互作用の病態の理解を深める目的で、それらを構成する腫瘍細胞に発現するケラチン(K)の種類と分布について免疫組織化学的に検索した。基底細胞癌は、腫瘍塊を構成するすべての腫瘍細胞に基底側の上皮細胞に特異的なK14がびまん性に検出されたのに対し、表層側の上皮細胞に特異的なK10は全く検出されなかったことから、基底細胞様の均質な腫瘍細胞から成る腫瘍であると考えられた。一方、扁平上皮癌と皮脂腺癌は、K10あるいはK14を様々な程度に発現していたことから、種々の分化の方向と程度の異

なった腫瘍細胞で構成されている腫瘍であると考えられたが、腫瘍塊の辺縁部に基底細胞様のK14陽性細胞の連続性の分布が観察される傾向がみられるとともに、それが不連続な部位近辺にアポトーシス小体が観察されたのは、腫瘍細胞と間質細胞との間の相互作用の病態を解明する上で重要な所見であると考えられた。(日眼会誌101:677-683,1997)

キーワード：眼瞼, 悪性腫瘍, ケラチン, 免疫組織化学

Immunohistochemical Distribution of Keratin in
Malignant Tumors of Eyelids

Fumiyuki Uehara and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

Abstract

The type and distribution of keratins (K) in malignant tumors of eyelids were examined immunohistochemically to understand the pathomechanism of intercellular interactions. All of the tumor cells in the basal cell carcinoma were positive for K14, which is specific for basal cells, whereas all of them were negative for K10, which is specific for suprabasal layers in stratified squamous epithelia. These findings suggest that basal cell carcinoma may consist of uniform, basal cell-like tumor cells. On the other hand, the squamous cell carcinoma and sebaceous carcinoma, which were positive for either K14 or K10 to varying extent, may consist of various

tumor cells with different types and degrees of differentiation. In these tumors, K14 was frequently detected throughout the border cells of the tumor mass. Apoptotic bodies were detected at the region where this continuous distribution of K14 was interrupted. These findings may help to clarify the pathomechanism of the interactions between the tumor cells and stromal cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 101:677-683, 1997)

Key words: Eyelid, Malignant tumor, Keratin, Immunohistochemistry

I 緒 言

眼瞼皮膚および結膜上皮の基底細胞は基底膜に接着、固定され、安定した構造を維持しながら絶えず細胞分裂を繰り返すことによって、表層へ向かって新しい上皮細胞を供給するとともに、基底膜を介して上皮組織の細胞と何らかの相互作用を営んでいるものと考えられる。

一方、外傷で上皮が欠損したときには、基底細胞は創傷面を側方に移動し、上皮を再生するという役割も演じている¹⁾。眼瞼腫瘍においては、腫瘍塊辺縁部に存在する腫瘍細胞が正常上皮の基底細胞に相当するような役割を果たしているものと考えられ、腫瘍塊が局所的に安定して増殖する機構、あるいは腫瘍細胞が周囲へ浸潤していく機構を解明するためには、腫瘍塊辺縁部の腫瘍細胞と、それ

別刷請求先：890 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行
(平成8年2月18日受付, 平成9年4月14日改訂受理)

Reprint requests to: Fumiyuki Uehara, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-shi, Kagoshima-ken 890, Japan
(Received February 18, 1996 and accepted in revised form April 14, 1997)

表 1 眼瞼悪性腫瘍のケラチン(K 10, K 14)の分布

症例	年齢	性	病理組織型	K 10 の分布		K 14 の分布		リンパ節転移
				腫瘍塊辺縁部	中 心 部	腫瘍塊辺縁部	中 心 部	
1	87	女	基底細胞癌	—	—	++	++	無
2	70	女	基底細胞癌	—	—	++	++	無
3	71	男	基底細胞癌	—	—	++	++	無
4	65	男	基底細胞癌	—	—	++	++	無
5	75	女	基底細胞癌	—	—	++	++	無
6	61	男	基底細胞癌	—	—	++	++	無
7	79	女	基底細胞癌	—	—	++	++	無
8	85	女	基底細胞癌	—	—	++	++	無
9	86	男	基底細胞癌	—	—	++	++	無
10	85	女	扁平上皮癌	+～++	+～++	+～++	+～++	有
11	86	女	扁平上皮癌	—～+	—～+	+～++	—～+	有
12	78	女	扁平上皮癌	—～+	+～++	+～++	—～+	無
13	78	男	扁平上皮癌	—～+	+～++	+～++	—～+	有
14	87	男	扁平上皮癌	—～+	—～+	+～++	+～++	有
15	70	男	扁平上皮癌	—～+	+～++	+～++	—～+	無
16	78	女	扁平上皮癌	—～+	+～++	+～++	—～+	無
17	79	男	皮脂腺癌	—～+	—～++	+～++	—～+	有
18	83	女	皮脂腺癌	—～+	—～+	+～++	+～++	有
19	47	男	皮脂腺癌	—～+	—～+	+～++	—～+	有
20	85	女	皮脂腺癌	—～+	—～+	+～++	—～+	無
21	53	男	皮脂腺癌	—～+	—～++	+～++	—～+	有

—：陽性細胞なし，+：陽性細胞あり，++：陽性細胞多数あり(半数以上が陽性)

に隣接した間質細胞との間の相互作用の仕組みについて理解する必要がある。

複合糖質の糖鎖は、種々の細胞間あるいは細胞—細胞外基質間の相互作用に際し、重要な役割を果たしている²⁾³⁾。著者らは、長年、眼科領域の複合糖質の研究に従事してきた関係から、眼瞼皮膚および結膜上皮の基底細胞と上皮下組織との間の、あるいは腫瘍塊辺縁部に局在する腫瘍細胞と周囲の間質細胞との間の相互作用に注目している。著者らは、この観点からまず、正常(ラット)眼瞼上皮²⁾や上皮が肥厚した脂漏性角化症³⁾の基底細胞の複合糖質合成の動態に関する糖鎖組織学的研究を開始するとともに、浸潤・転移能が低いとされている基底細胞癌と、高いとされている扁平上皮癌や皮脂腺癌⁴⁾との間の複合糖質の差異に関する糖鎖組織学的研究を進めている。これらの研究を進める過程で、腫瘍組織における細胞間相互作用を深く理解するためには、細胞表面の複合糖質だけでなく、その他の、例えば細胞骨格構成要素などに関する情報も合わせて、複数の視点から検討する必要性を感じるに至った。

ところで、上皮系細胞の中間径線維であるケラチンは、その発現する分子種が細胞の分化の程度と方向によって極めて特異的に規定されている¹⁾。例えば、ケラチン

10(K 10)は、表皮の有棘細胞、顆粒細胞および角質細胞に発現するのに対し、ケラチン 14(K 14)は、基底細胞にのみ発現する¹⁾。したがって、上皮性腫瘍においては、K 14の発現性の有無を調べることによって基底細胞様の腫瘍細胞を、K 10の発現性の有無を調べることによってその他の上皮細胞様の腫瘍細胞をそれぞれ同定できる可能性がある。眼科領域においては、眼球のケラチン分布に関する報告⁵⁾⁶⁾は過去にいくつかみられるが、眼瞼の悪性腫瘍のケラチン発現分布に関する研究は未だ乏しい状況にあり、皮膚科領域からの報告⁷⁾⁸⁾などが散見される程度である。そこで、腫瘍組織における細胞間相互作用の仕組みを明らかにすることを念頭に置いて、特に腫瘍塊辺縁部に注目しながら、眼瞼基底細胞癌とその他の悪性眼瞼腫瘍における K 10 と K 14 の発現分布について、免疫組織化学的手法を用いて比較検討した。

II 実験方法

鹿児島大学医学部附属病院眼科において手術を行い、病理組織学的診断の確定した最近の眼瞼悪性腫瘍の症例の中から、基底細胞癌 9 例、扁平上皮癌 7 例、皮脂腺癌 5 例を本研究の対象とした(表 1)。腫瘍組織を 10% ホルマリン液を用いて浸漬固定し、アルコール脱水、パラフィン

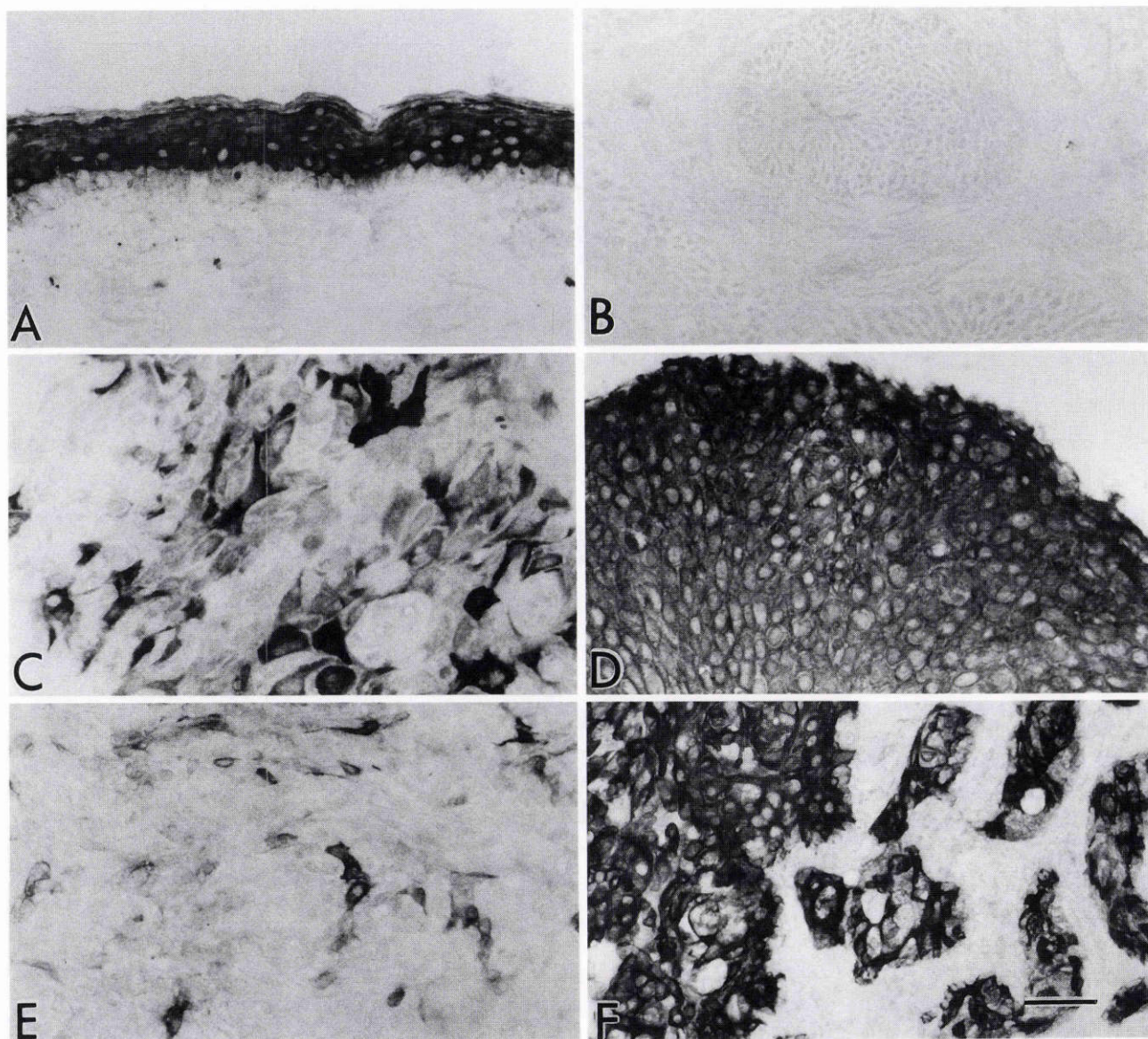


図1 眼瞼腫瘍組織のケラチン 10 (K 10) に対する抗体の結合分布像。

A: 健常部眼瞼上皮, B: 基底細胞癌, C: 扁平上皮癌, D: 扁平上皮癌, E: 皮脂腺癌, F: 皮脂腺癌。
A~F のバーは 40 μ m

包埋した、5 μ m の厚さの光学顕微鏡用の組織切片を作製、脱パラフィンし、クエン酸緩衝液に浸漬、加圧・加熱処理して抗原賦活した。0.2% 過酸化水素/メタノールで内因性ペルオキシダーゼ活性を 3% ウマ血清〔磷酸緩衝液 (PBS) に溶解 (0.01 M, pH 7.4)] で抗体の非特異的吸着をそれぞれ抑制した。次に、2 種類のケラチン (K 10, K 14) に対する抗体 (PBS に 100 倍希釈溶解: Novocastra 社, 英国) をそれぞれ室温で 1 時間ずつ反応させた。対照としては、非免疫マウス血清を同様に反応させた。組織切片を PBS を用いて洗浄した後、二次抗体としてビオチン標識した抗マウス IgG (免疫グロブリン G) を室温で 1 時間反応させた。Vectastain Elite ABC Kit (Vector 社, 米国) とジアミノベンチジンをを用いてペルオキシダーゼ発色させた。それぞれの眼瞼腫瘍の腫瘍塊 (辺縁部と中心部) を構成する腫瘍細胞と、健常部眼瞼上皮のケラチン

(K 10, K 14) の発現分布について光学顕微鏡を用いて観察した。

III 結 果

表 1 に、患者の年齢、性、病理組織診断名および腫瘍塊の辺縁部と中心部とに分けて、それぞれの腫瘍の K 10 および K 14 に対する抗体結合分布の程度について示した。すべての症例で、経過観察できた範囲において遠隔臓器への転移はみられていないが、リンパ節 (耳前～頸部) 転移がみられた症例が存在したため、それらの有無についても表 1 に記載した。

K 10 に対する抗体は、健常部の眼瞼では有棘細胞から表層側の上皮細胞の細胞質に結合した (図 1 A)。基底細胞癌では 9 例すべての症例で抗体の結合像は全く検出されなかった (図 1 B, 表 1 の症例 2)。扁平上皮癌では抗体

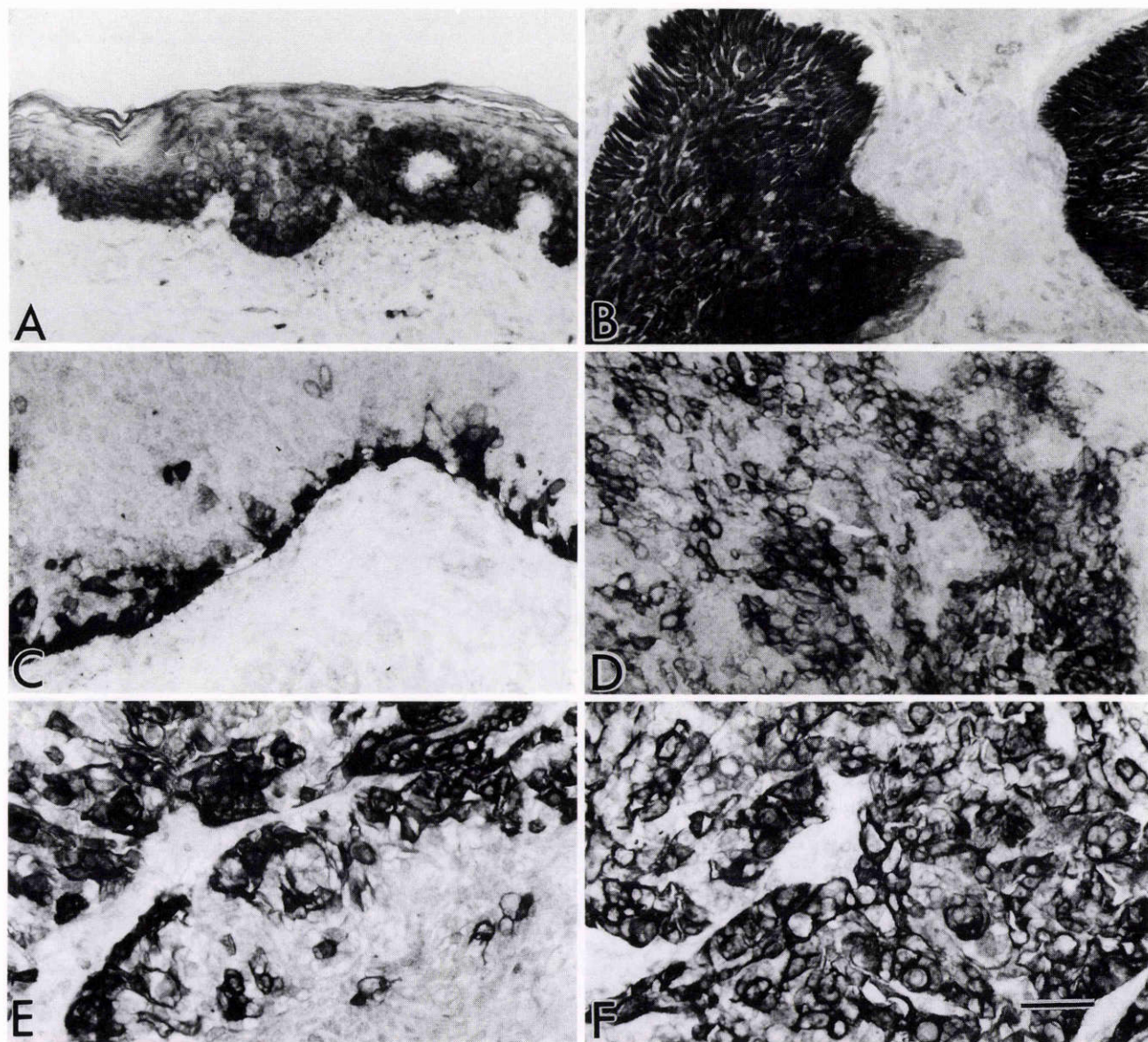


図2 眼瞼腫瘍組織のケラチン14(K14)に対する抗体の結合分布像。

A: 健常部眼瞼上皮, B: 基底細胞癌, C: 扁平上皮癌, D: 扁平上皮癌, E: 皮脂腺癌, F: 皮脂腺癌。
A～Fのバーは40 μ m

の結合像が散在性に検出された例(図1C, 表1の症例14)から, 密に検出された例(図1D, 表1の症例10)まで観察され, 個体差がみられた。皮脂腺癌でも抗体の結合像がほとんど検出されなかった例, あるいは散在性に検出された例(図1E, 表1の症例18)から, 比較的密に検出された例(図1F, 表1の症例21)まで観察された。扁平上皮癌, 皮脂腺癌ともに同一症例の組織でも, 腫瘍の部位によって腫瘍塊に占めるK10の陽性細胞の割合には差がみられる傾向があったために, 表1のK10に対する抗体結合分布の程度は, 例えば+～++(表1の症例10)というように, 一定の範囲を表すように記載せざるを得なかった。

K14に対する抗体は, 健常部の眼瞼では基底側の1～数層の上皮細胞の細胞質に結合した(図2A)。基底細胞癌では9例すべての症例において, 腫瘍塊を構成する

ほとんどすべての腫瘍細胞の細胞質にびまん性に結合した(図2B, 表1の症例1)。扁平上皮癌では抗体の結合像が散在性に検出された例(図2C, 表1の症例13)から, 比較的密に検出された例(図2D, 表1の症例14)まで観察され, K10の分布と同様に個体差がみられた。皮脂腺癌でも抗体の結合像がほとんど検出されなかった例, あるいは散在性に検出された例(図2E, 表1の症例17)から, 比較的密に検出された例(図2F, 表1の症例18)まで観察され, 個体差がみられた。扁平上皮癌, 皮脂腺癌ともに同一症例の組織でも部位によって腫瘍塊に占める陽性細胞の割合には差がみられたが, 一般に腫瘍塊の辺縁部に分布する腫瘍細胞ほど, K14の陽性率が高いようにみえた(図2C～F, 表1の腫瘍塊辺縁部)。表1のK14に対する抗体結合分布の程度も, 例えば+～++(表1の症例14)というように一定の範囲を表すように記載した。

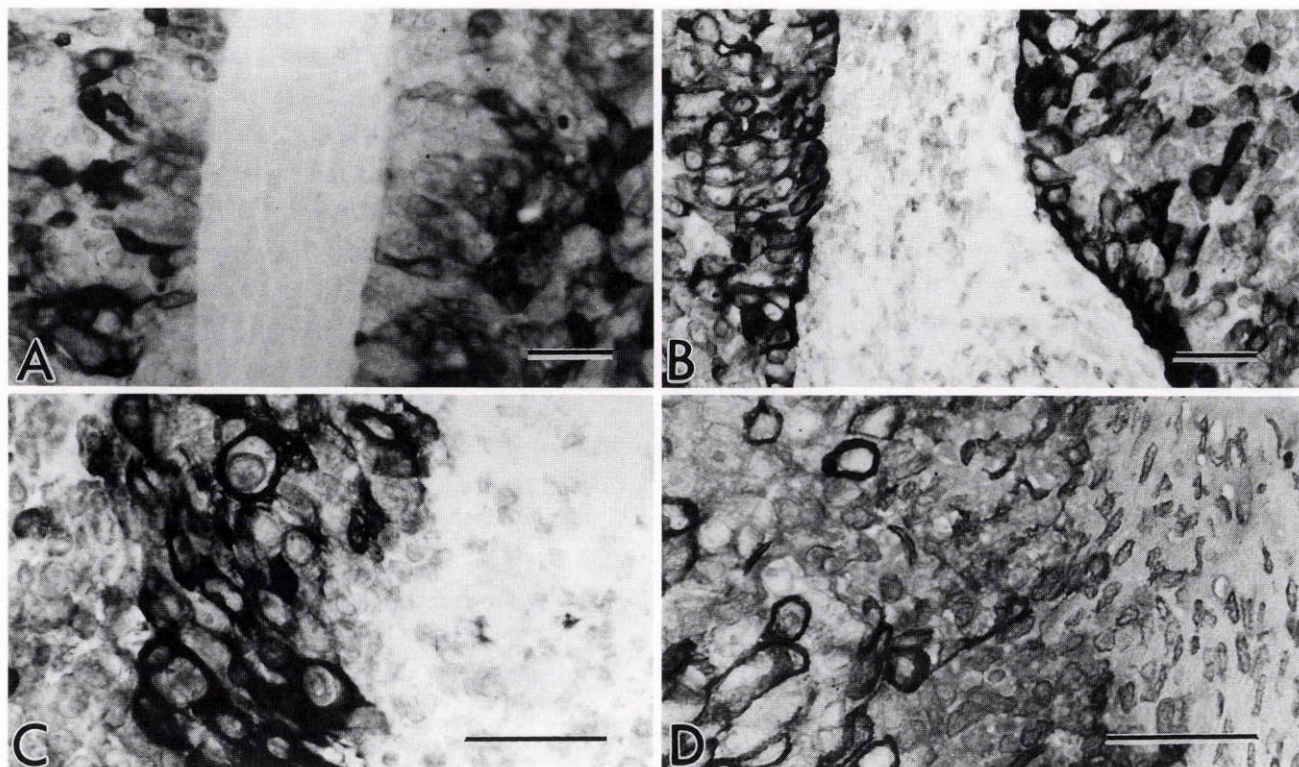


図3 眼瞼扁平上皮癌のK10およびK14に対する抗体の結合分布像。

A: K10に対する抗体の結合分布像, B~D: K14に対する抗体の結合分布像, A~Dのバーは40 μm

腫瘍塊の辺縁部のK10とK14の分布の関係について、興味深い所見が混在して観察された扁平上皮癌(表1の症例16)の免疫染色像を図3に示した。間質組織を挟んで二つの腫瘍塊が観察されるが、K10に対する抗体は腫瘍塊の辺縁部に存在する細胞にはほとんど結合せず、腫瘍塊内部の細胞に散在性に結合した(図3A)。それに対して、K14に対する抗体は腫瘍塊の辺縁が比較的明瞭な部分では腫瘍塊内部の細胞に散在性に結合しただけでなく、腫瘍塊の辺縁部に、間質組織との境界壁を形成するように存在する細胞に連続的に結合した(図3B)。腫瘍塊の辺縁が少し不明瞭な部分ではK14に対する抗体の分布の連続性に乱れが観察され(図3C)、さらに、腫瘍塊に接してアポトーシス小体様の細胞が観察される領域ではK14に対する抗体の分布の連続性は完全に失われ、強く抗体が結合する腫瘍細胞(図3D, 左側)と、中等度から軽度抗体が結合する小細胞が散在性に観察された(図3D, 右側)。

非免疫マウス血清を反応させた組織切片は、健常部眼瞼においては上皮基底層に散在性にメラニン色素が観察されるだけで、ペルオキシダーゼ発色像はほとんど微弱にしか観察されなかった(図4A)。また、いずれの腫瘍組織も同様に、ペルオキシダーゼ発色像はほとんど微弱にしか観察されなかった(図4B)。

IV 考 按

まず健常部の眼瞼に関し、K10に対する抗体は有棘細

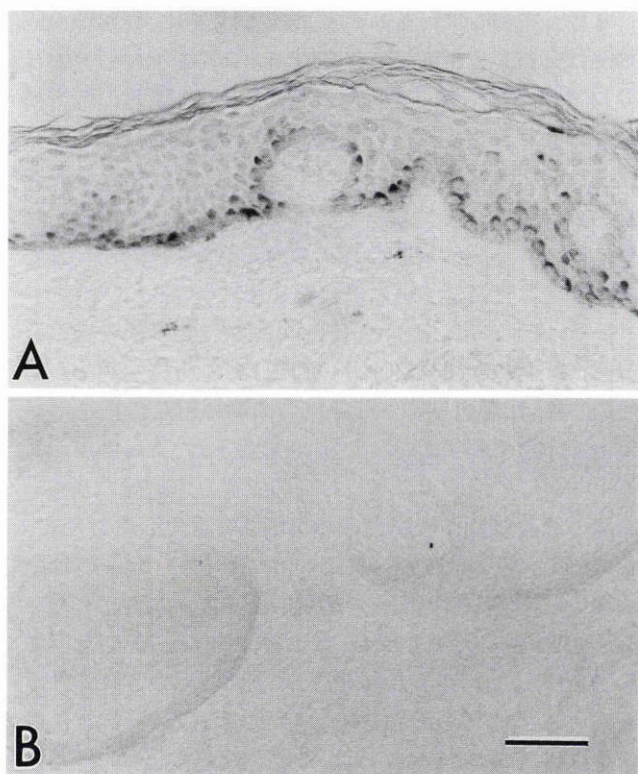


図4 非免疫マウス血清を反応させた免疫組織像。

A: 健常部眼瞼上皮, B: 基底細胞癌, A, Bのバーは40 μm

胞から表層側の上皮細胞に、K14に対する抗体は基底側の上皮細胞にそれぞれ結合することが確認されたことか

ら、今回使用した抗体はそれぞれの上皮細胞への分化の程度を判別するためのマーカーとして使用できるものと考えられる。

基底細胞癌の腫瘤塊を構成する腫瘍細胞は、腫瘤の辺縁部の柵状構造を形成する細胞だけでなく、腫瘤塊の中心部に分布している細胞も共通して K 14 を発現していたことから、すべての腫瘍細胞が基本的には基底細胞の性質を保有しているものと考えられる。一方、基底細胞癌の腫瘤塊は K 10 を全く発現していなかったことから、有棘細胞への分化の傾向は全くみられない腫瘍細胞だけで構成されていることも同時に明らかになった。著者らは先に、正常上皮の基底細胞も基底細胞癌の腫瘍細胞も、ともに Ki 67 抗原が陽性で、活発に分裂・増殖していることを報告⁹⁾した。この観点からすれば、基底細胞癌は増殖能に富む均一な基底細胞様の腫瘍細胞から成る腫瘍であると定義することができるであろう。

次に、扁平上皮癌と皮脂腺癌は個々の症例の間だけでなく、一つの腫瘤塊を構成する腫瘍細胞の間でも発現するケラチンの種類が異なっており、分化の方向と程度の異なった種々の腫瘍細胞で構成されていることが判明した。扁平上皮癌と皮脂腺癌の腫瘤塊を構成する腫瘍細胞が種々の分化の方向と程度を示していることは、一個一個がその置かれた環境に適応して変化する能力を有していることを表しているのかも知れない。特に、腫瘤塊の辺縁部に分布する腫瘍細胞は基底側の上皮細胞に特異的な K 14 を発現する傾向がみられたことから、周囲の間質組織との間に介在し、通常基底細胞が担っているような役割を果たしているのかも知れない。このような基底細胞様の細胞によって腫瘍塊辺縁を囲まれた腫瘍塊は、間質に分布する免疫細胞からの攻撃を受けることなく、局所で安定して増殖し続けるのかも知れない。

一方、図 3 に示した症例(表 1 の症例 16)の腫瘤塊の辺縁部が不明瞭な部分で、K 14 発現分布の連続性が失われている像は、腫瘍細胞と間質細胞の間の相互作用を考える上で非常に興味深い。一つの可能性としては、腫瘍が間質へ向かって浸潤しようとして腫瘤塊の辺縁部の基底細胞様の腫瘍細胞が浸潤性の腫瘍細胞に変化したために、その細胞が K 14 を失ったのかも知れない。あるいは腫瘤塊の辺縁部の腫瘍細胞が細胞表面の性状が変化したため間質細胞の攻撃を受け、アポトーシスに陥る過程で K 14 を失ったのかも知れない。図 3 D に観察されるアポトーシス小体様の細胞にも、軽度ではあるが K 14 に対する反応がみられたことは、これらの細胞が K 14 陽性の基底細胞様の腫瘍細胞由来であることを表しているのかも知れない。いずれにしろ、腫瘤塊辺縁部の K 14 陽性像の連続性の喪失は腫瘍の浸潤、あるいはアポトーシスなどの腫瘍細胞と間質細胞の間の相互作用の変化に重要な役割を果たしているものと考えられる。

経過観察中にリンパ節転移を起こした症例は、従来か

ら報告⁴⁾されているように基底細胞癌では 1 例もみられなかった。基底細胞癌の腫瘍塊全体が K 14 陽性の基底細胞様の腫瘍細胞から構成されており、腫瘤塊辺縁部を含め、基底細胞以外の性質を持った腫瘍細胞への分化傾向が全くみられないために局所的に安定で、リンパ節転移を起こすことはないものと考えられる。それに対して、扁平上皮癌は 7 例中 4 例が、皮脂腺癌は 5 例中 4 例がリンパ節転移を起こしていた。これらの腫瘍は表 1 に腫瘍塊辺縁部の K 14 分布が + ~ ++ と記載したように、すべての腫瘍塊の辺縁部腫瘍細胞が K 14 陽性というわけではなく、基底細胞様の腫瘍細胞が欠損する不連続な辺縁部分の存在が腫瘍のリンパ節転移と何らかの関係があるようにみえる。一方、症例 16 で、現在までのところリンパ節転移が確認されていないのは、腫瘤塊辺縁部の腫瘍細胞が間質細胞の攻撃を受けてアポトーシスに陥っている像が観察されたことと関係があるかも知れない。

ところで、腫瘍のケラチン分布に関する報告は、主として皮膚腫瘍に関するものがこれまでにいくつか散見される。Ansai ら⁷⁾は、皮脂腺癌とその他のいくつかの種類の皮膚腫瘍との間の鑑別診断にケラチンの免疫組織化学的検索が有用であると述べている。彼らが検索したケラチンは、著者らが検索したケラチンとは種類が異なっていることから、直接的な比較考察はできない。一方、Ramnarain ら⁸⁾は、皮膚の基底細胞癌の手術に際し、その切除断端をケラチンに反応する抗体を用いて免疫組織化学的に検索し、腫瘍細胞の浸潤の有無を判定するのに利用している。このように、過去の報告はいずれも腫瘍の診断にケラチン分布を利用しようというものである。そこで、著者らの研究結果についても、このような腫瘍診断学との関連で少し考察してみたい。形態学的には扁平上皮に分化しつつあるようにみえても、K 10 を発現していない腫瘍は低分化型の癌腫とみなした方がよいであろう。また一見、形態学的に基底細胞癌のようにみえる腫瘍でも K 10 を発現している場合や、K 14 をびまん性には発現していない場合には基底細胞癌である可能性は低いであろう。このように、K 10 と K 14 のケラチン分布の免疫組織化学的検索は、本研究の目的である眼瞼悪性腫瘍組織の細胞間相互作用の病態研究に利用できるだけでなく、過去の報告と同様に、病理組織診断の補助診断としても有用であると考えられる。

本研究は、文部省科学研究費(基盤 C 07671928)の補助によって行った。

文 献

- 1) 北島康雄：細胞骨格と細胞接着の構造・機能とその異常としての皮膚疾患。月田承一郎(編)：分子医学シリーズ 2, 細胞構造と機能。メジカルビュー社、東京、89-116, 1996。
- 2) 上原文行, 柳田豊子, 岩切直人, 大庭紀雄：ラット眼瞼上皮の糖鎖組織化学的解析。日眼会誌 101: 385-388, 1997。

- 3) 上原文行, 大庭紀雄, 米澤 傑, 小澤政之: 眼瞼脂漏性角化症の糖鎖組織化学的解析. 日眼会誌 101: 429—433, 1997.
 - 4) 沖坂重邦: 眼瞼腫瘍. 沖坂重邦(編): 眼病理アトラス, 1版, 文光堂, 東京, 131—134, 1992.
 - 5) Kasper M: Heterogeneity in the immunolocalization of cytokeratin specific monoclonal antibodies in the rat eye: Evaluation of unusual epithelial tissue entities. Histochemistry 95: 613—620, 1991.
 - 6) Kurpakus MA, Maniaci MT, Esco M: Expression of keratins K 12, K 4 and K 14 during development of ocular surface epithelium. Curr Eye Res 13: 805—814, 1994.
 - 7) Ansai S, Katagata Y, Yoshikawa K, Hashimoto H, Hozumi Y, Kondo S, et al: An immunohistochemical study of sebaceous carcinoma with anti-keratin monoclonal antibodies: Comparison with other skin cancers. J Dermatol 21: 553—559, 1994.
 - 8) Ramnarain ND, Walker NP, Markey AC: Basal cell carcinoma: Rapid techniques using cytokeratin markers to assist treatment by micrographic (Mohs') surgery. Br J Biomed Sci 52: 184—187, 1995.
 - 9) 上原文行, 大庭紀雄: 眼瞼腫瘍の Ki 67 抗原発現分布の免疫組織化学. あたらしい眼科 13: 1411—1413, 1996.
-