

免疫染色によるセンチネルリンパ節乳癌細胞の検出

北里大学病院 病院病理部

山下 和也、梶田 咲美乃、三枝 信

【はじめに】

乳癌の手術における腋窩リンパ節郭清は、術後の疼痛やしびれなど患者 QOL への影響が大きい。原発腫瘍部から腋窩リンパ節群に転移を生じる過程には、初めに転移が起こるリンパ節が存在し、癌のリンパ行性転移の門番として Sentinel (歩哨) リンパ節と呼ばれる。この Sentinel リンパ節 (SLN) の転移が陰性のときは、腋窩リンパ節郭清をする必要はなく、術後後遺症の発症を低減できる。従って、術中迅速病理診断の SLN 生検は術式決定を左右する。そして、永久標本の検索は術後の治療方針に係わるため、腫瘍細胞の確実な検出が求められている。このためには、SLN 組織から多くの標本を作製する (標本の割面や切片を多く薄切する) 方法が有効であるが、アーティファクトの発生しやすい凍結切片やその後の永久標本から微小な転移癌細胞を検出するためには、見落としの低減及び、形態学的診断根拠が大切であり、この点において免疫染色が役立つ。今回は免疫染色における SLN 中の乳癌細胞検出について解説する。

【マーカーの選択】

乳癌症例で主に陽性を示す腫瘍マーカーの陽性率 (当院無作為 50 症例) は、抗 GCDFP-15 抗体 (図 1a)、抗 MUC-1 抗体 (図 1b)、抗 CEA 抗体でそれぞれ、54%、98%、32.4%である。この腫瘍マーカーは、陰性症例が存在するため、転移検索には必ずしも有効ではない (図 1c)。上皮系マーカーの抗サイトケラチン (CK) 抗体は、分子量によって染色性が異なる。乳癌症例では、低分子量 CK である抗 CK5/6 (clone : D5/6 B4) 抗体および抗 CK7 (clone : OV-TL 12/30) 抗体にそれぞれ、13.5%、94%の陽性を示す。さらに、低分子量と高分子量 CK を混ぜ合わせたカクテル抗体と呼ばれる抗体 (clone : AE1/AE3) と CK7,8 に反応する抗体 (clone : CAM5.2) の陽性率はともに 100%である。乳癌細胞では CK7,8,18,19 が陽性を示すことから、抗 CK カクテル抗体 (clone : AE1/AE3、ニチレイバイオサイエンス社) は CK1-8、CK10、CK 14-16、CK 18/19、を包括する抗体として乳癌細胞の転移検出に良好な染色結果を示す。

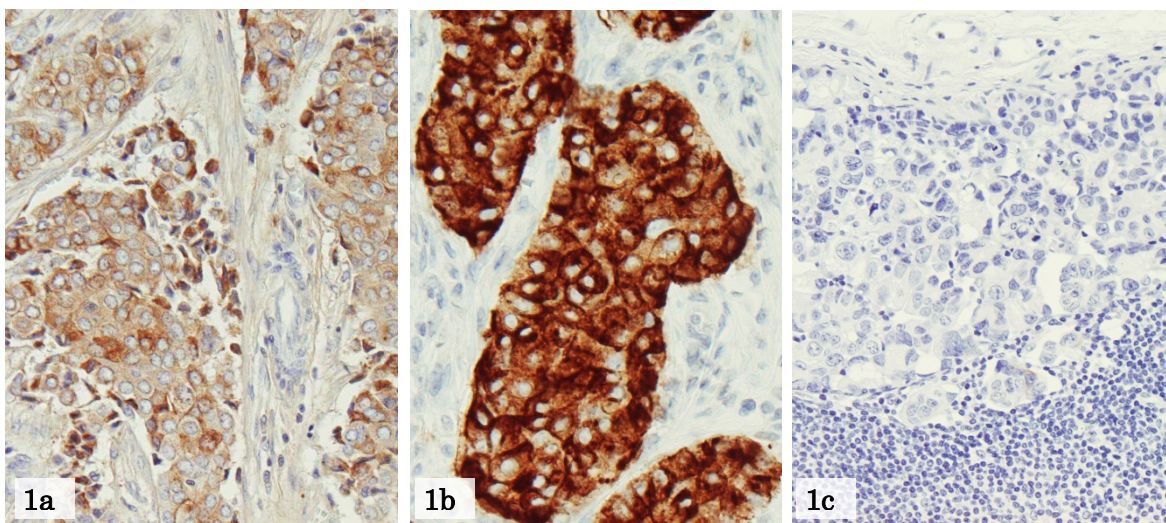


図 1 乳癌細胞における抗体反応性評価

- 1a : 乳癌原発部の腫瘍細胞に一致して抗 GCDFP-15 抗体が陽性を示す。
- 1b : 乳癌原発部の腫瘍細胞に一致して抗 MUC-1 抗体が陽性を示す。
- 1c : SLN 転移部の腫瘍細胞において抗 GCDFP-15 抗体が陰性を示した症例。

SLNの術中迅速診断ではしばしば、迅速時に作製した薄切H&E染色切片で腫瘍は認められず、永久標本により腫瘍細胞が検出されることや、氷晶化による核内空洞化、採取挫滅による核染などのアーティファクトが生じ、腫瘍細胞の同定が困難な症例がある。このような症例について、抗CKカクテル抗体(clone: AE1/AE3)は細胞質に陽性を示し、腫瘍細胞の同定に有効である。特に Isolated tumor cell (ITC) と呼ばれる 200 μ m以下の微小な病変(図2a)では、腫瘍陽性切片が稀少であることから、網羅的かつ陽性率の高い抗CKカクテル抗体(clone: AE1/AE3)による免疫染色(図2b)が有効である。

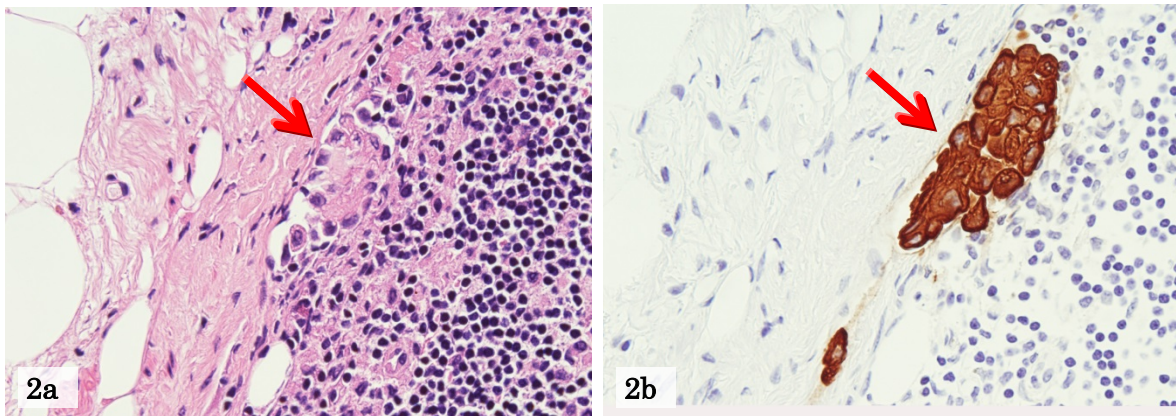


図2 SLNの転移検出陽性像

- 1a: 術中迅速病理診断に提出された腫瘍細胞(矢印)陽性SLN組織のH&E染色標本。
 2b: 同一部位の抗CKカクテル抗体(clone: AE1/AE3)による染色。腫瘍細胞が陽性を示す。

【抗CKカクテル抗体(clone: AE1/AE3)の免疫染色条件】

1. 各種抗原賦活化処理

検出手法により色調と陽性率は異なる。各種抗原賦活化処理後にシンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス社)を用いた染色結果を示す。免疫染色は、自動免疫染色装置を用いた。抗原賦活化処理を実施しない条件(図3a)、pH6.0のクエン酸緩衝液(図3b)、Trypsin消化処理(図3d)やProteinase K消化処理(図3e)後の染色は、陽性は示すものの、色調と陽性細胞数について満足すべき結果ではない。pH9.0のEDTA賦活化処理(98 $^{\circ}$ C、20分: 図3c)とProtease処理(0.06%、Tris-HCL buffer pH8、20分間室温: 図3f)の抗原賦活化処理条件が至適であった。

凍結切片では抗原賦活化処理を実施しないで染色が可能であるが、必ず陽性コントロールを併用しなければならない。

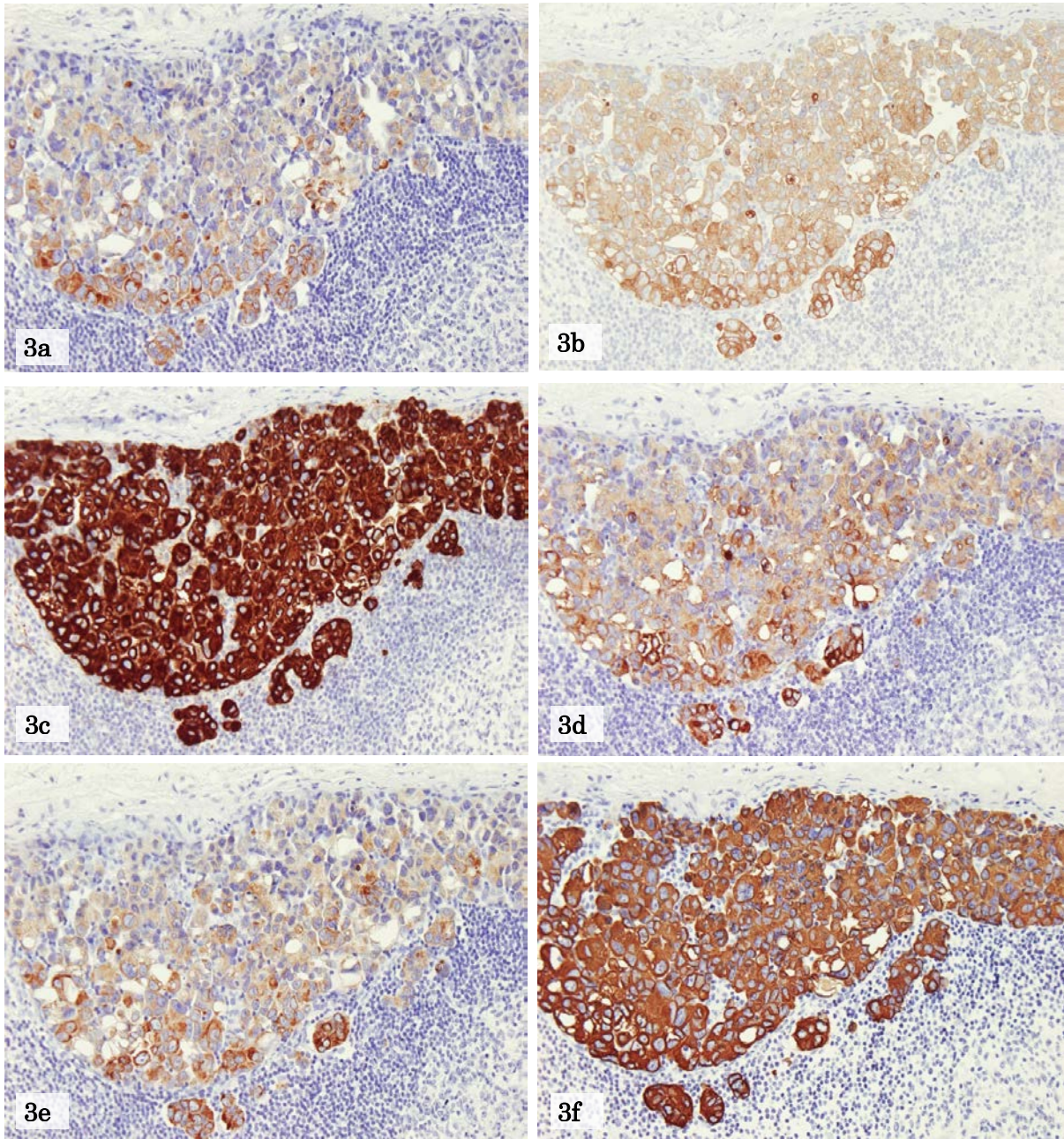


図3 20%緩衝ホルマリン固定後のSLN組織に対する抗原賦活条件の検討

3a : 抗原賦活法処理を実施していない。

3c : pH9.0 EDTA 緩衝液による抗原賦活処理。

3e : Proteinase K 消化処理。

3b : H6.0 クエン酸緩衝液による抗原賦活処理。

3d : Trypsin 消化処理。

3f : Protease 処理。

2. 検出 kit の比較(0.06% Protease の抗原賦活化処理)

①シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (Polymer 法:ニチレイバイオサイエンス社)と②SAB-PO キット (SAB 法:ニチレイバイオサイエンス社)に顕著な差は認められない(図 4a、b)。

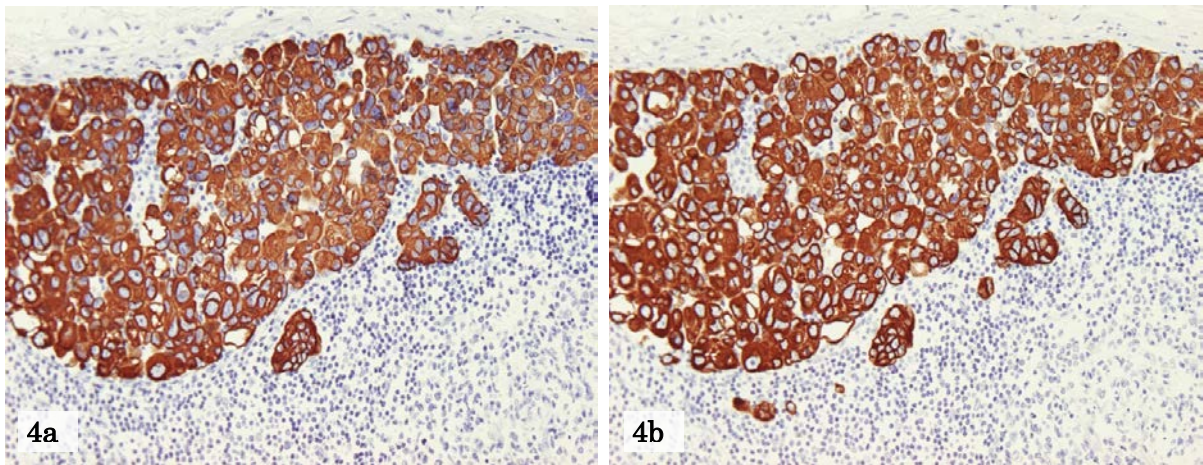


図 4 検出 kit の比較

4a : SAB 法による検出。

4b : Polymer 法による検出。

【非特異反応と留意点】

抗 CK カクテル抗体 (clone : AE1/AE3) の特異性と陽性率は高い。一方、陽性細胞の存在は 1 つの時も転移陽性の判断に至るため、染色結果の評価について正確であることが大切である。本抗体の非特異的反応についての事例を示す。pH9.0 の EDTA 緩衝液による抗原賦活化処理においては、リンパ管の一部 (図 5a) と線維芽細胞の一部 (図 5b) が非特異的反応を示すことがある。また、機器や検出系の相違は、組織球への反応性が見られ (図 6a)、低分化腺癌などの鑑別では留意すべき点となる。上皮細胞のコンタミネーション (図 6b) も (clone : AE1/AE3) に陽性を示し、特に細胞 1 個単位のコンタミネーションは鑑別が困難であり、特に留意すべき点である。この様な時には連続切片による H&E 染色、リンパ節辺縁のリンパ洞や脈管内であるかなどの所見が重要である。

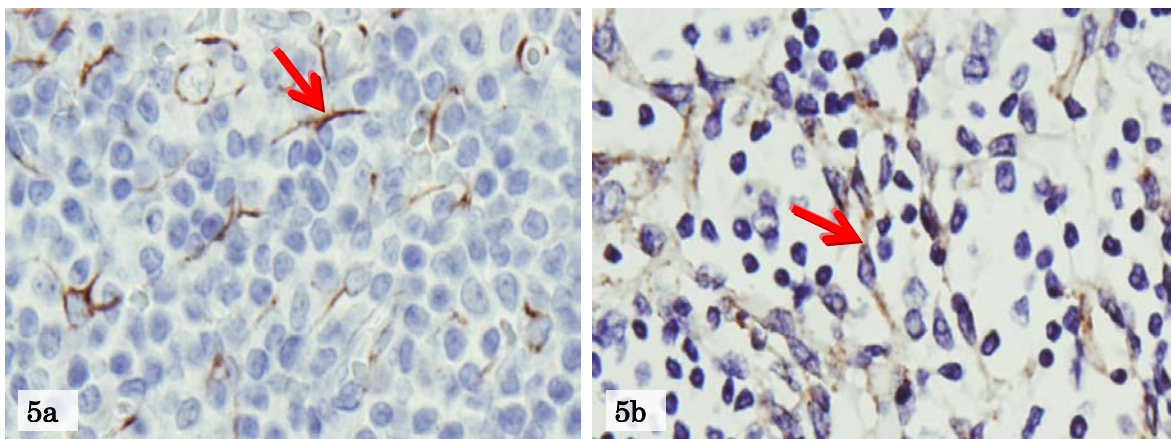


図 5 pH9.0 の EDTA 緩衝液による抗原賦活化処理において見られた非特異的反応

5a : リンパ管の陽性像。

5b : 線維芽細胞の陽性像。

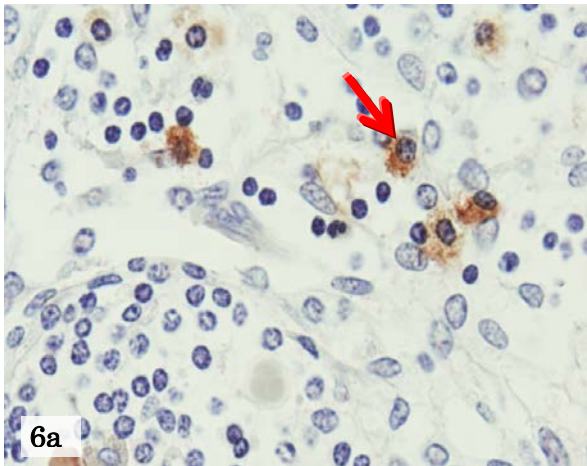
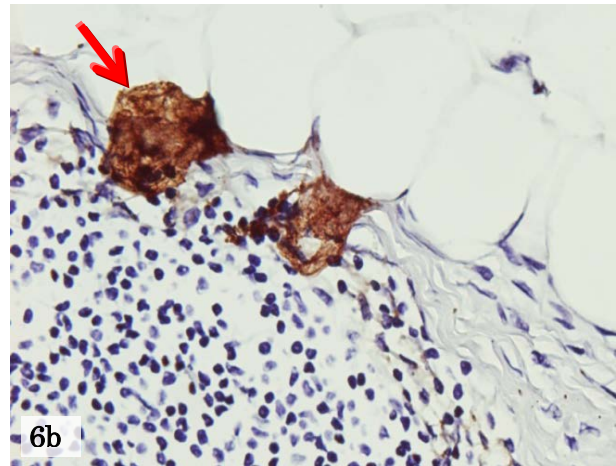


図6 非特異的反応を示す例

6a：組織球への非特異的陽性像。



6b：コンタミネーションによる角化細胞の陽性像。

【応用】

乳癌原発組織の Ki-67 Index は、約 90%の症例が陽性を示すが、陽性細胞率は、10%未満 2 割、10~20%が 5 割、20%~50%が 2 割、50%以上は 1 割であり、リンパ球も同時に陽性を示す(図 7a)。一方、抗 Cyclin-D1 抗体（ニチレイバイオサイエンス社）では、陽性症例率と陽性腫瘍細胞率共に 90%を示し、リンパ球の陽性率は低い(図 7b)。この特性を応用し抗 CK カクテル抗体（clone：AE1/AE3）と増殖因子（抗 Cyclin-D1 抗体(図 7d)）との 2 重染色が可能となり、腫瘍細胞の検出率向上につながる。

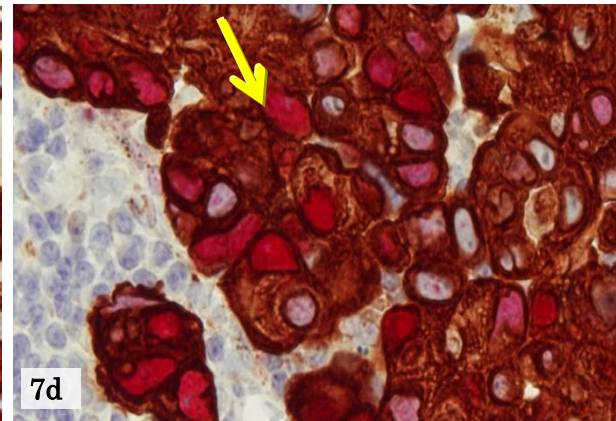
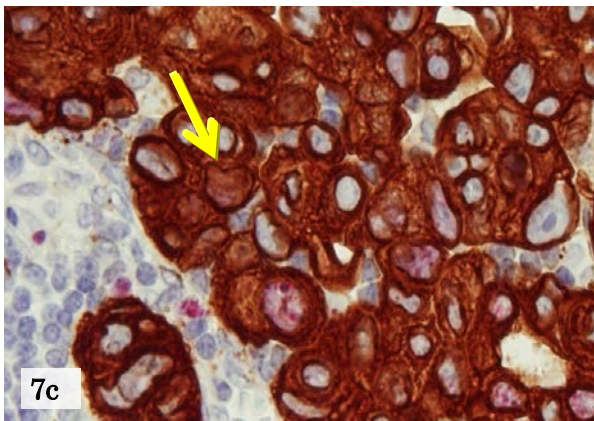
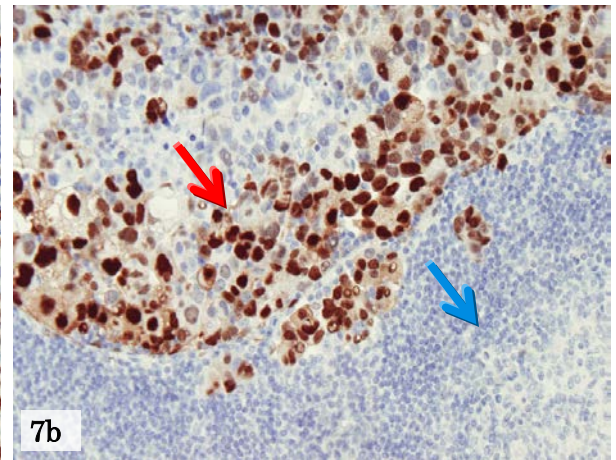
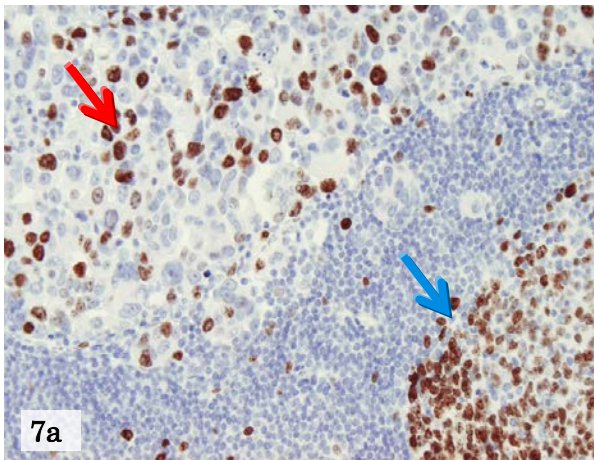


図7 転移陽性 SLN における CK と増殖因子の染色像。

7a：増殖因子 Ki-67 陽性像。

7b：増殖因子 cyclin D1 陽性像。上皮特異的陽性部位（赤矢印）：リンパ球陽性部位（青矢印）

7c, d：CK と増殖因子（7c：Ki-67、7d：cyclinD1）の 2 重染色像。発色褐色：サイトケラチン、発色赤色：増殖因子（黄色矢印）。

【まとめ】

乳腺センチネルリンパ節の検索において抗サイトケラチンカクテル抗体 (clone : AE1/AE3) の使用は、1 個の腫瘍細胞の検出を可能とすることから、検出率を大きく向上させる。推奨される染色手順の要点を以下に示す。() 内は迅速凍結切片の条件を示す。

- ① pH9.0 抗原賦活溶液 98°C20 分あるいは 0.06% Protease 溶液室温 20 分の処理
(迅速凍結切片では不要、固定液はアルコール 90 : ホルマリン原液 10 : 酢酸 1)
- ② スーパーブロック 室温 5 分 (1 分)
- ③ 抗サイトケラチンカクテル抗体 (clone : AE1/AE3) 室温 20 分 (5 分)
- ④ シンプルステイン MAX- PO (MULTI) 室温 20 分 (5 分)
- ⑤ DAB 発色

【参考文献】

- 1) 坂口忍, 山下 和也, 蔵並 勝 他: サイトケラチン免疫組織化学染色による乳癌センチネルリンパ節転移の検出. *Medical Technology* 39. 2. p165-172. 2011
- 2) 阿部仁: 3 ステップ、アビジン-ビオチンシステム (SAB 法) とポリマー法. ニチレイバイオサイエンス免疫染色玉手箱. 技術 <http://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/technical.html>
- 3) 弓納持 勉: ケラチン sub type と病理診断への応用. ニチレイバイオサイエンス免疫染色玉手箱. 技術 <http://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/technical.html>