

## 臨床および実験報告

## HERCEP TEST における特異な染色様式を契機に

## 見出された神経内分泌成分を含む乳癌の 1 例

## 自験例と文献的考察

三枝 順子<sup>1</sup> 大秋 美治<sup>1</sup> 小黒 辰夫<sup>1</sup> 清水 秀樹<sup>1</sup>  
 赤坂 久美<sup>1</sup> 京本 晃典<sup>1</sup> 黒川 実愛<sup>1</sup> 新井 悟<sup>1</sup>  
 森 修<sup>1</sup> 岡田 進<sup>2</sup> 京野 昭二<sup>3</sup> 田中 宣威<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 日本医科大学付属千葉北総病院病理部

<sup>2</sup> 日本医科大学付属千葉北総病院放射線科

<sup>3</sup> 日本医科大学付属千葉北総病院外科

Breast Cancer with Neuroendocrine Differentiation Detected by  
 Unique Staining Pattern of Neoplastic Cells in Hercep Test

Junko Mieda<sup>1</sup>, Yoshiharu Ohaki<sup>1</sup>, Tatsuo Oguro<sup>1</sup>, Hideki Shimizu<sup>1</sup>, Kumi Akasaka<sup>1</sup>, Akinori Kyomoto<sup>1</sup>,  
 Mie Kurokawa<sup>1</sup>, Satoru Arai<sup>1</sup>, Osamu Mori, Susumu Okada<sup>2</sup>, Syoji Kyono<sup>3</sup> and Noritake Tanaka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital

<sup>2</sup>Department of Radiology, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital

<sup>3</sup>Department of Surgery, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital

## Abstract

Hercep Test (DAKO) is an immunohistological screening kit to select cases of advanced breast cancer with indication for treatment with a humanized mouse monoclonal antibody to human epidermal growth factor receptor-2, trastuzumab (Herceptin). We report a case of an 84-year-old female with invasive ductal carcinoma of the right breast, whose neoplastic cells showed a unique staining pattern in Hercep Test. The cells showed an intracytoplasmic fine granular staining pattern, instead of the membranous pattern of typical breast cancer cells. This unique staining pattern suggested some special features of the neoplastic cells. This case was finally diagnosed as invasive ductal carcinoma with focal neuroendocrine differentiation by subsequent immunohistochemical and electron microscopic examinations. The neoplastic cells showed positive reactivity for Grimelius stain, chromogranin A, synaptophysin, and neuron-specific enolase, as well as electron-dense neurosecretory granules (up to 150 nm in diameter). This unique staining pattern of the neoplastic cells with Hercep Test is a useful clue to detect breast cancer with neuroendocrine differentiation, which is likely to be missed in routine examination. Clinical and pathologic findings including immunohistochemical and ultrastructural findings of this case are reported, together with a brief review of the literature. (J Nippon Med Sch 2004; 71: 203-208)

Key words: HERCEP TEST, breast cancer, neuroendocrine differentiation, HER 2, neurosecretory granule

Correspondence to Junko Mieda, Department of Pathology, Chiba-Hokusoh Hospital, Nippon Medical School, 1715 Kamagari, Inba-mura, Inba, Chiba 270-1694, Japan

E-mail: j-mieda@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jnms/>)

## 緒言

Hercep Test (DAKO) (以下 HT と略す) は進行性乳癌に対する治療薬抗 HER-2 ヒト化単クローン抗体 Trastuzumab (Herceptin) の適応例を選択するために開発された免疫組織学的検出法である。癌遺伝子 HER-2/*neu* (以下 HER2) は細胞膜貫通型蛋白をコードし、細胞増殖や分化に関与するとされ、HER2 蛋白の腫瘍細胞膜における過剰発現の有無を半定量的に検索する。乳癌では 25~30% の症例で HER2 蛋白の過剰発現が認められ<sup>1</sup>、これらの症例では予後不良、ホルモン療法への抵抗性なども報告されている<sup>2</sup>。今回、本検査施行中に特異な染色様式を呈し、その後の検索により神経内分泌 (以下 NE と略す) 成分を含む浸潤性乳管癌であることが判明した乳癌症例を経験したので若干の文献的考察を含め報告する。

## 症例

84 歳、女性。家族歴：両親：肺結核。既往歴：72 歳：胆石症にて胆嚢切除術。現病歴：右乳腺 D 領域の腫瘍を主訴に平成 14 年 7 月 23 日当院外科を受診した。超音波検査にて、形状不整で辺縁は粗雑、境界エコーの肥厚、内部エコーは不均一、後方エコーの減弱が見られ、マンモグラフィでは右 D 領域に 2.2×1.5 cm の腫瘍を認め、多角形で辺縁は微細鋸歯状、内部は高濃度で石灰化像を伴わず、悪性が示唆される所見であった (図 1)。穿刺吸引細胞診が施行され、浸潤性乳管癌と診断されたため、同年 8 月 23 日乳房部分切除およびリンパ節廓清術が施行された。穿刺吸引細胞診所見：細胞採取量は豊富で、細胞密度の高い乳頭状発育形態を示し、周辺には腫瘍細胞が孤立散在性に多数認められた。Class V, 推定診断：浸潤性乳管癌 (図 2a, b)。肉眼所見：摘出腫瘍は最大径 1.5 cm の境界明瞭な乳灰白色、充実性腫瘍であった (図 3)。組織学的所見：腫瘍組織は小型類円形の腫瘍細胞が敷石状充実に増殖し、周囲を繊細な間質が取り囲む充実腺管癌が主体を占め、辺縁部では乳頭腺管癌の成分も見られ浸潤性乳管癌 (pT1pN0M0, Stage I) と診断された (図 4)。

## 方法

当施設では、乳癌症例のほぼ全例に対し HT, 組織学的ホルモンレセプター (以下 HR と略す) 検査に加

え、電顕試料作製を実施しており、本例も通常の病理診断後、採取試料を用い各種検査を実施した。また、HT にて胞体内に通常とは異なる顆粒状の陽性像を認めたことから NE 的性格を示す可能性を考慮し、特染および免疫染色を施行した。

HT：表 1 に示すごとく HT を施行した。HR に対する免疫組織学的検査：HT 用試料から連続切片を作製し HR (ER, PgR) の免疫染色を施行した (表 2)。電顕的検索：新鮮標本から採取された組織片を 2.5% グルタルアルデヒドで固定、型のごとくエボン包埋し超薄切片を作成。電子染色後観察した。免疫組織学的検索：HT 用試料から連続切片を作製し、LSAB 2 キットを用いて免疫染色を行った (表 2)。

## 結果

HT：一部の腫瘍細胞胞体内に細顆粒状の陽性像を認めた。陽性顆粒は細胞質辺縁に集簇するものから、瀰漫性に分布するものまで見られた (図 5a)。しかし、本来の HT の判定基準である細胞膜には陽性像を認めず判定は score 0 であった。HR：ER：3+, PgR：2+ と判定された。Grimelius 染色, chromogranin A, NSE, synaptophysin 抗体による免疫染色において同部位の腫瘍細胞に陽性像を認めた (図 5b, c)。電顕的にも腫瘍細胞胞体内に最大径 150 nm までの NE 顆粒を認めた (図 6)。以上の所見より最終的に NE 成分を含む浸潤性乳管癌と診断された。

## 考察

当施設では進行例に加え初発乳癌症例においても、予後予測、将来の治療方針決定時の情報提供としてほぼ全例に HT を施行し結果を臨床に報告している。本例は特異な染色様式を契機に、その後の検索により NE 的性格を示す乳癌であることが判明した症例であった。NE 的性格を示す乳癌としては、1963 年 Feyrter らが carcinoid growth pattern を示す乳癌を報告し<sup>3</sup>、1977 年 Cubilla らが NE 細胞への分化を示す carcinoid 腫瘍を報告<sup>4</sup> して以来、NE 的形質を有する乳癌が、carcinoid tumor, argyrophilic carcinoma, adenocarcinoma with neuroendocrine differentiation, small cell carcinoma として多数報告<sup>5</sup> されている。文献的に発生頻度は、乳癌の 3~25%<sup>6,7</sup>、浸潤性乳管癌では 15~71% (粘液癌では 20~50%)<sup>8,9</sup>、浸潤性小葉癌に限定すると 50~100% などの報告<sup>10</sup> が見られるが、現在では、Azzopardi ら<sup>11</sup> の全乳癌症例の 5% 前



図1 マンモグラフィー像 多角形で辺縁は微細鋸歯状，内部は高濃度，石灰化像は伴わない。

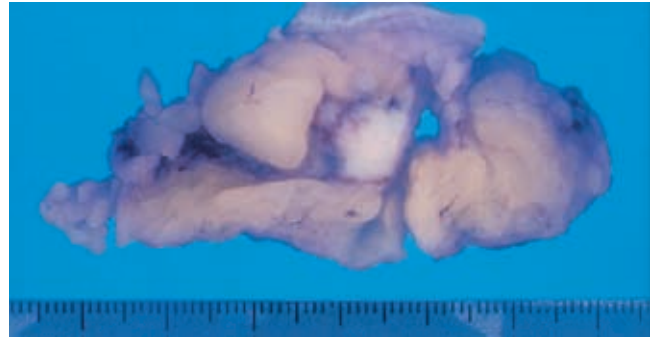


図3 肉眼像 境界明瞭な乳灰白色，充実性腫瘍を認める。

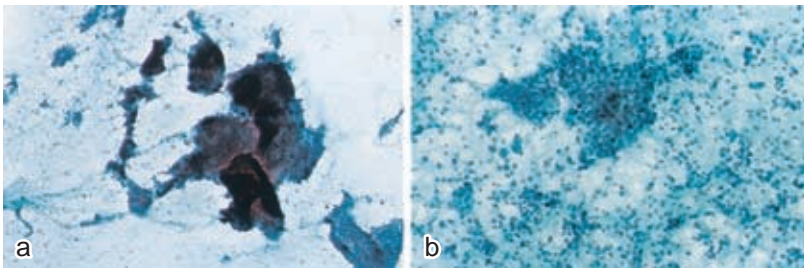


図2 細胞像 細胞密度の高い乳頭状集塊 (a) 周辺に腫瘍細胞が孤立散在性に多数認められる (b)。

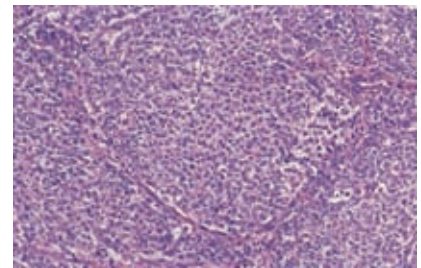


図4 組織像 小型類円形の腫瘍細胞が敷石状充実性に増殖した浸潤性導管癌を認める。

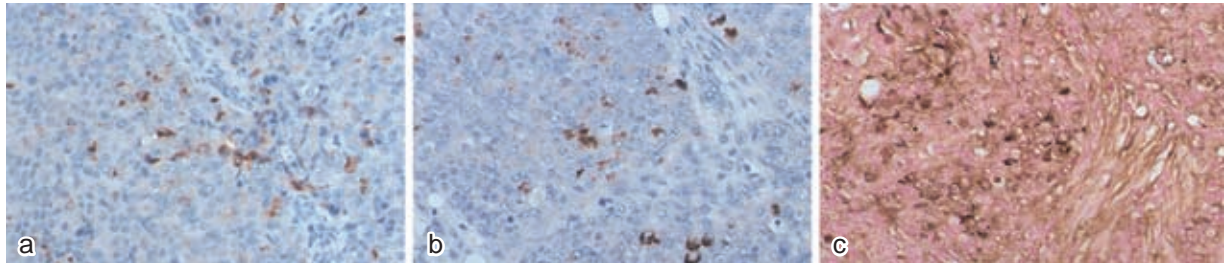


図5a 一部の腫瘍細胞胞体内に顆粒状の陽性像を認める (HER2)。

図5b, c HER2 陽性像と同部位の腫瘍細胞に陽性像を認める (b: Chromogranin A, c: Grimelius 染色)。

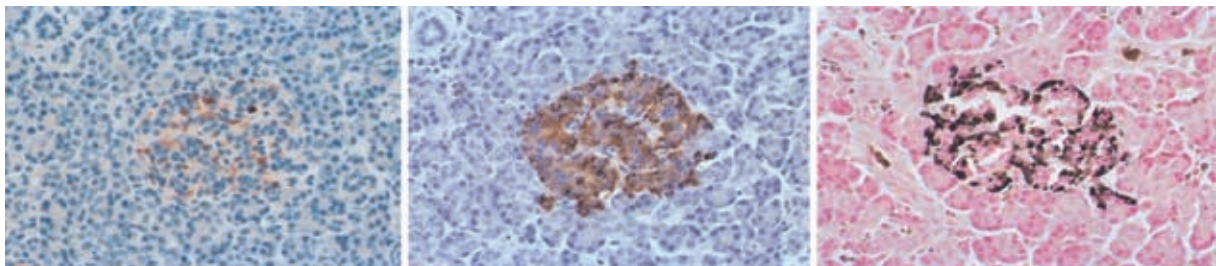


図7a, b, c 膵臓ラ氏島に陽性像を認める (a: HER2, b: Chromogranin A, c: Grimelius 染色)。

表1 Hercep Test 染色手順 ( DAKO )

Step1	新鮮な腫瘍組織片を10%緩衝ホルマリンにて24時間固定
Step2	型のごとくパラフィン包埋後、4 $\mu$ mの薄切標本作製
Step3	脱パラフィン 水洗
Step4	抗原賦活処理 (クエン酸緩衝液) ① 抗原賦活液で95~97 $^{\circ}$ Cの温浴槽 (ヤマト科学製、ウォーターバスBM400) 処理で40分間の前処理を行い、その後室温にて20分間放置する。 ② 水洗後、洗浄液に5分間浸漬。
Step5	内因性パーオキシダーゼのブロッキング (過酸化水素水) ① ブロッキング試薬を滴下し、室温5分間反応。 ② 水洗後、洗浄液に5分間浸漬。
Step6	一次抗体の反応 ① 抗ヒトHER2/neu・ウサギポリクローナル抗体を滴下し、常温にて30分間反応。 ② 洗浄液にて洗い流し、洗浄液に5分間浸漬。 ③ 新しい洗浄液に交換し、更に5分間浸漬。
Step7	ポリマー試薬の反応 ① ポリマー試薬 (パーオキシダーゼ標識デキストラン結合抗ウサギイムノグロブリン) を滴下し、常温にて30分間反応。 ② 洗浄液にて洗い流し、洗浄液に5分間浸漬。 ③ 新しい洗浄液に交換し、更に5分間浸漬。
Step8	発色基質液の反応 ① 基質緩衝液 (イミダゾール緩衝液、過酸化水素水) 1ml に発色基質 (3,3'-ジアミノベンチジンテトラヒドロクロライド) を1滴滴下し混和。 ② 切片上に滴下し、常温にて10分間反応。 ③ 精製水にて洗い流す。
Step9	対比染色と脱水・透徹・封入 ① マイヤーのヘマトキシリンにて核染色 (1分間) ② 脱水・透徹・封入

表2 使用一次抗体

	メーカー	希釈倍率	免疫動物	前処理
ER	DAKO	$\times 50$	MOUSE	95 MW 処理 40分間
PgR	DAKO	$\times 50$	MOUSE	95 MW 処理 40分間
Chromogranin A	DAKO	$\times 100$	RABBIT	
synaptophysin	DAKO	$\times 100$	MOUSE	DAKO Proteinase K 常温 10分間
NSE	DAKO	$\times 200$	MOUSE	95 MW 処理 40分間

MW: 日新 EM MWF-2 クエン酸緩衝液 pH6.0 にて処理

後が妥当とされている。しかし、grimelius 染色により好銀性を示す報告例には、他の検索でNE 的性格を証明しえない例も含まれており、真のNE 的性格の証明には、免疫組織学的、電顕的検索が必須と考えられる<sup>12,13</sup>。一方、文献的にもNE 組織や腫瘍におけるHER2 蛋白の発現を検討した報告<sup>14-17</sup> が散見され、我々も同様の検索を行ったところ、膵臓のラ氏島においてchromogranin A, grimelius 染色と同様の染色様式を示すHER2 蛋白の陽性像を認めた (図7a, b, c)。以上より、HT に用いられる一次抗体がNE 的性格を示す細胞内物質を認識している可能性が強く示唆され

る。Mori ら<sup>18</sup> は、乳癌培養細胞株を用い、胞体内に顆粒状にHER2 蛋白の陽性像が得られた細胞に免疫電顕的観察を行い、細胞膜、粗面小胞体、ゴルジ装置、核膜にHER2 蛋白の局在を認めたと報告している。NE 細胞内に抗HER2 蛋白抗体の結合性を示す機序としては、HER2 蛋白の細胞内における役割の解明とともに、共通抗原の存在や抗体の交叉反応性などの可能性も含め更に検討が必要と考えられる。

最後に、NE 細胞への分化の有無による乳癌の予後に関しては、大差はないとする報告<sup>5,19</sup> がある一方、腋窩リンパ節転移、再発率や死亡率はNE 成分を伴う

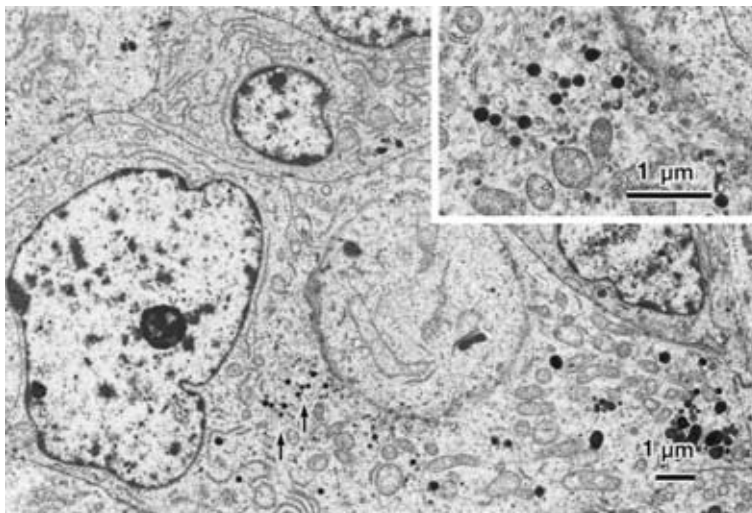


図6 電顕像 腫瘍細胞胞体内に150 nm までのNE 顆粒を認める。(矢印およびinset)

乳癌が、陰性乳癌より高いとする報告<sup>7</sup>があり、今後、NE 的性格を有する乳癌の細胞学的、組織学的特徴および反応物質の性格について検討してゆきたいと考える。

### 結 論

HT 施行に際し特異な染色様式を示した乳癌症例を経験し、その後の検索によりNE 的性格を有する成分を含むことが示された。HER2 蛋白を認識する抗体が、NE 成分とも反応することが示されたことから、HT における染色標本の詳細な観察が通常では見逃され易いNE 的性格を有する乳癌の検出に有用であることが示唆された。

### 文 献

- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A: Studies of the HER-2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712.
- 橋詰 薫, 神原由季, 畑中 豊, 谷 洋一: Hercep Test によるHER 2 過剰発現乳癌スクリーニングの有用性と問題点. *病理技術* 2002; 65: 9-11.
- Feyrter F, Hartmann G: Über die carcinoid Wuchsform des Carcinoma solidum (gelatinosum) mammae. *Frank Z Pathol* 1963; 73: 24-39.
- Cubilla AL, Woodruff JM: Primary carcinoid tumor of the breast: A report of eight patients. *Am J Surg Pathol* 1977; 1: 283-292.
- 梅村しのぶ: 乳腺に発生する神経内分泌腫瘍. *病理と臨床* 1999; 12: 1263-1268.
- Rosen PP: Mammary Carcinoma with Endocrine Features. *Rosen's breast pathology*, second edition, 2001; pp 497-501, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Nesland JM, Holm R, Johannessen JV: A study of different makers for neuroendocrine differentiation in breast carcinomas. *Pathol Res Pract* 1986; 181: 524-530.
- Fisher ER, Palekar AS: Solid and mucinous varieties of so-called mammary carcinoid tumors. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 909-916.
- Capella C, Eusebi V, Mann B, Azzopardi JG: Endocrine differentiation in mucoid carcinoma of the breast. *Histopathology* 1980; 4: 613-630.
- 土屋真一: 乳腺カルチノイド腫瘍. *病理と臨床* 2001; 5: 491-495.
- Azzopardi JG, Muretto P, Goddeeris P, Eusebi V, Lauweryns JM: Carcinoid tumors of the breast: the morphological spectrum of argyrophil carcinomas. *Histopathology* 1982; 6: 549-569.
- Bussolati G, Gugliotta P, Sapino A, Eusebi V, Lloyd RV: Chromogranin-reactive endocrine cells in argyrophilic carcinomas ("carcinoid") and normal tissue of the breast. *Am J Pathol* 1985; 120: 186-192.
- Maluf HM, Zukerberg LR, Dickersin GR, Koerner FC: Spindle-cell argyrophilic mucin-producing carcinoma of the breast: Histological, ultrastructural, and immunohistochemical studies of two cases. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 677-686.
- Martin-Lacave I, Utrilla JC: Expression of a *neu/c-erbB-2*-like product in neuroendocrine cells of mammals. *Histol Histopathol* 2000; 15: 1027-1033.
- Nesland JM, Ottestad L, Heikilla R, Holm R, Tveit K, Borresen AL: *c-erbB-2* Protein and Neuroendocrine Expression in Breast Carcinomas. *Anticancer research* 1991; 11: 161-167.
- Kritzik MR, Krahi T, Good A, Gu D, Lai C, Fox H, Sarvetnick N: Expression of *erbB* receptors during

- pancreatic islet development and regrowth. J Endocrinol 2000; 165: 67-77.
- 17 . Wang DG, Johnston CF, Buchanan KD: Oncogene expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: implications for pathogenesis. Cancer 1997; 80: 668-675.
- 18 . Mori S, Akiyama T, Morishita Y, Shimizu S, Sakai K, Sudoh K, Toyoshima K, Yamamoto T: Light and electron microscopical demonstration of *c-erbB-2* gene product-like immunoreactivity in human malignant tumors. Virchows Arch B 1987; 54: 8-15.
- 19 . 内藤善哉, 横山宗伯, 杉崎祐一, 前田昭太郎, 永井祥子, 浅川一枝, 松原美幸, 渡會泰彦: 神経内分泌細胞への分化を伴った浸潤性乳癌の3例. 日本臨床細胞学会雑誌 2002; 1: 14-20.

( 受付 : 2003 年 8 月 1 日 )

( 受理 : 2003 年 9 月 4 日 )

---