

唾液腺に発生した多形腺腫の腫瘍成分に関する病理組織学的検討

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

林 國雄

(指導：福本 雅彦 教授)

目次

参考論文 1

概要 2

第 1 章

緒言 5

対象および方法 6

結果 8

考察 9

第 2 章

緒言 13

対象および方法 14

結果 16

考察 17

総括 24

参考文献 25

参考論文

本論文は、主となる参考論文「Usefulness of SOX-10 and EGFR for pericapsular evaluation of pleomorphic adenomas」 International Journal of Oral-Medical Sciences : 第 22 卷 3 号 令和 6 年 3 月 発行予定および副となる参考論文「Histopathological classification of pleomorphic adenoma in the salivary glands: an analysis of tumoral components」 International Journal of Oral-Medical Sciences : 第 22 卷 3 号 令和 6 年 3 月 発行予定をまとめたものである。

概要

多形腺腫は唾液腺腫瘍の中で発生頻度が最も高く、その割合は全唾液腺腫瘍の約 2/3 を占めている。本腫瘍の好発部位は耳下腺であり、次いで口蓋腺に多く発生する。多形腺腫の治療法は主に切除で、予後は良好といわれているが、再発や悪性転化した症例の報告もある。多形腺腫の再発の原因としては、患者の年齢、手術手技、多彩な間質成分等の関与が指摘されている。通常全身諸臓器において、「腺腫」に分類される腫瘍は腺上皮細胞の増殖のみから構成されるが、唾液腺の上皮性腫瘍（腺腫）である多形腺腫は、組織学的に、上皮成分と間質様成分が混在し、極めて多彩な形態を示す特徴があり、個々の症例で組織構築が異なる。1976 年 Seifert らは多形腺腫の組織多彩性に注目し、その組織構築のバリエーションによる分類を確立した。ただし、この分類の根幹となる研究は耳下腺症例主体で、他の大唾液腺（顎下腺、舌下腺）や、口腔外科臨床で遭遇する機会が比較的多い小唾液腺症例に関する知見は乏しい。

そこで、第 1 章では耳下腺のみならず小唾液腺や顎下腺症例（舌下腺症例は存在しなかった）を含めた多形腺腫の組織多彩性を検証する目的で、Seifert 分類に準じて解析することとした。

1985 年～2019 年の期間に日本大学松戸歯学部附属病院病理診断科にて多形腺腫の病理組織診断がなされた 104 例を対象とした。

本腫瘍の上皮成分において、大唾液腺（顎下腺）と小唾液腺症例との間で有意な差が認められなかったが、角化を伴う扁平上皮化生は全症例で 30.8%であり、Seifert の報告 (2.5%) よりも多く存在した。この結果の根拠は人種差によるもの以外では、口腔粘膜（重層扁平）上皮と近接し物理的刺激を享受しやすい小唾液腺症例において発生しやすいことに関連している可能性がある。

一方、間質様成分では Seifert 分類の各タイプ (subtype 1～4, 存在しなかった 2d を除く) において大唾液腺症例と小唾液腺症例との間に有意差が認められた。

粘液軟骨様構造 (subtype 2c) の発生率は小唾液腺症例 (7.9%) よりも大唾液腺症例 (35.7%) の方が高値であったのに対し、硝子化/線維化構造の比率は大唾液腺症例 (50.0%) よりも小唾液腺症例 (59.2%) でやや高値であった。

大唾液腺と小唾液腺における多形腺腫間の組織学的相違は、発生部位により粘液腺、漿液腺およびその両者から構成される混合腺が存在し、かつ混合腺も粘液腺と漿液腺の存在比率が発生部位によって異なる。このような発生母組織自体の組織構築の違いが大唾液腺と小唾液腺症例間の差異に関連している可能性がある。また従来から硝子化/線維化構造が顕著に認められる領域が多形腺腫の悪性転化に関係するとの報告もあり、Seifert 分類の subtype による病理組織学的評価は臨床上の重要性が高い。

第 2 章では、第 1 章で得られた病理組織学的知見、特に大唾液腺症例と小唾液腺症例で有意差を認めた間質様成分に注目し、口蓋腺症例を対象とした免疫組織化学的検索を実施した。この研究では Seifert 分類に含まれていた間質成分の割合と組織所見のうち、腫瘍実質に対する腫瘍間質の占める割合が同様である subtype 3 と subtype 4 を分けずに、一括して cellular type として取り扱い、また subtype 1 は classic type, subtype 2 を stroma-rich type とした。

また、間質様成分の形成に関与する腫瘍性筋上皮のマーカーである SRY (Sex Determining Region Y)-box 10 (以下, SOX-10) と、細胞増殖・分化のマーカー Epidermal Growth Factor Receptor (以下, EGFR) 抗体を用いた免疫組織化学的検討を実施した。多形腺腫は通常被膜を有し、その被膜に近接する部分が健常部との境界域となるため、その部位の腫瘍性筋上皮細胞の出現に注目した。

病理組織学的に、subtype 別発生率は、classic type が 43.2%, stroma-rich type は 43.2%, cellular type は 13.6%であった。

免疫組織化学的に SOX10 陽性細胞率は、cellular type (84.7%) が最も高値を示し、次いで classic type (58.3%) , stroma-rich type (45.5%) の順であった。また、そ

れぞれ 3 つの subtype 間で有意差 ($p < 0.001$) を認めたことから, Seifert 分類は被膜近傍の腫瘍性筋上皮細胞の出現比率と深く関係している可能性が示された. EGFR は主として導管上皮様細胞の細胞膜で陽性所見が認められた. EGFR の immunoreactive score (以下, IRS) では, cellular-rich type (スコア 3) で最も高値を示し, 次いで classic type (スコア 1~2), stroma-rich type (スコア 0~1) であったことから cellular-rich type は他の type と比較し, 腫瘍細胞の増殖・分化といった生物学的活性が高い可能性が示唆された.

この研究結果から, 小唾液腺における多形腺腫は Seifert 分類と生物学的活性との関係が示唆された. 特に, cellular-rich type は SOX10 と EGFR の染色態度に鑑み生物学的活性が高い可能性が示された.

第1章

Histopathological classification of pleomorphic adenoma in the salivary glands: an analysis of tumoral components

(唾液腺における多形腺腫の組織病理学的分類:腫瘍成分の分析)

緒言

多形腺腫は全唾液腺腫瘍の 54-76%を占める最も代表的な唾液腺腫瘍で、耳下腺に発生することが多いとされる(1). 治療法は切除が一般的で通常、予後は良好であるが、しばしば再発するため、周囲組織を含めた切除が望まれる。また、経過観察において 5 年以内に 1.5%で悪性転化する可能性があり、15 年以上未治療の場合は悪性転化の可能性が増加する(2).

多形腺腫は病理組織学的に実質である腺上皮成分と腫瘍性筋上皮に起因する間質様成分が混在し、多彩な組織形態を示す。腫瘍性筋上皮細胞は紡錘形、円形、多角形、形質細胞様や明細胞など多種の細胞形態を呈する(3). また間質様成分では、粘液腫様、軟骨様、粘液軟骨様、硝子様あるいは線維化等の種々の構造が観察される。多形腺腫のこれらの多彩な病理組織学的所見に基づき、Seifert らは 1976 年に多形腺腫の亜分類 (subtype) を提唱している(4). しかし、多形腺腫の研究は Seifert 分類を含めて耳下腺に発生した症例を対象としたものが多く(3, 5-7), 他の大唾液腺 (顎下腺, 舌下腺) や小唾液腺についての詳細は不明である(3, 8).

本研究の目的は、Seifert 分類に準じて大唾液腺 (耳下腺, 顎下腺) 及び、口腔外科臨床で遭遇する機会の比較的多い小唾液腺に発生した症例を病理組織学的に分類し、口腔外科臨床に資するより精緻な病理組織学的特徴を明らかにすることである。

材料および方法

1985年～2019年に日本大学松戸歯学部附属病院病理診断科にて多形腺腫の病理組織診断がなされた104例を対象とした。本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (EC20-19-023-1号) の承認を得て実施した。

1. 臨床病理学的検索

症例は電子カルテデータに記載された病変の臨床所見を解析した。

2. 病理組織学的検索

検体は、10%ホルマリンにて浸漬固定され、通法に従いパラフィン包埋がなされた。パラフィン包埋ブロックは4 μ m厚に薄切した切片標本を作製した。染色はヘマトキシリン-エオジン染色 (以下、HE染色) を行った。

作製されたスライドガラス標本は2名の口腔病理専門医によって次の評価を行った。

1) 上皮成分の評価 (Fig.1)

上皮成分は、Seifert分類に基づいて導管上皮様細胞および腫瘍性筋上皮細胞、扁平上皮様細胞、角化を伴う扁平上皮化生、オンコサイト化生、脂腺細胞様細胞、杯細胞、基底細胞様細胞、線条部導管様細胞を評価した(4)。

2) 間質様成分の評価 (Fig.1)

Seifert分類の記載に基づいて、粘液腫様、軟骨様、粘液軟骨様、硝子様、線維様、脂肪様、束状、および骨様構造の評価を行った(4)。

3) Seifert分類に基づく分類 (Fig.1)

以下のように4つのsubtypeに分類した(4)。

subtype 1：間質様成分が30-50%を含む典型的な多形腺腫。

subtype 2：間質様成分が80%を含む。

- subtype 2a : 粘液腫様構造
- subtype 2b : 軟骨様構造
- subtype 2c : 粘液軟骨様構造
- subtype 2d : 束状構造
- subtype 2e : 硝子化/線維化構造

subtype 3 : 間質が 20-30%以下で, subtype 1 と同様の上皮成分

subtype 4 : 間質が 20-30%以下で, subtype 3 よりも上皮成分の生物学的活性が高い.

大唾液腺症例と小唾液腺症例の間での subtype の頻度の差を統計ソフト R (ver4.3.1, development core team)を使用し Fisher の正確確率検定を行った.

結果

1. 臨床病理学的結果

臨床病理学的結果を示す (Table 1) . 女性 67 名 (64.4%) , 男性 37 名 (35.6%) であった. 平均年齢は 51.37 歳, 13 歳から 91 歳までの範囲であった. 発生部位は, 口蓋腺 50 例 (48.1%) , 耳下腺 (16 症例, 15.4%) , 頬腺 (15 症例, 14.4%) , 顎下腺 (12 症例, 12.5%) , 口唇腺 (10 症例, 9.6%) , 歯肉 (1 症例, 1.0%) であった.

2. 病理組織学的検索

上皮成分, 間質様構造の結果を (Table 2) に示す. 上皮成分は導管上皮様細胞および腫瘍性筋上皮細胞 94.2%, 扁平上皮様細胞 100%, 角化を伴う扁平上皮化生 30.8%, オンコサイト化生 3.8%, 脂腺細胞様細胞 10.6%, 杯細胞様細胞 3.8%に観察された. 間質様構造は, 粘液腫様構造 51.0%, 軟骨様構造 1.9%, 粘液軟骨様構造 15.4%, 硝子化構造 56.7%, 線維化構造 53.8%, 脂肪様組織 1.0%で, 束状構造と骨様構造は観察されなかった.

Seifert 分類の結果を (Table3) に示す. Subtype 1 は 31.7%, subtype 2a は 17.3%, subtype 2b は 1.0%, subtype 2c は 11.5%, subtype 2e は 25.0%, subtype 3 は 10.6%, subtype 4 は 2.9%であった. 各 subtype の発生頻度において, 大唾液腺と小唾液腺で有意差が見られた ($p=0.001$).

考察

唾液腺腫瘍の画像診断や病理検査による診断は、その形態学的な多様性は、画像診断や病理検査による診断が困難になる場合がある(9,10). 多形腺腫は唾液腺腫瘍で最も発生頻度の高い腫瘍であるが、腫瘍性筋上皮細胞の影響で非常に多彩な組織像を示すため、発生部位による差異が存在するか否かなどの詳細については明らかではない。

本研究対象は、女性が多く (男女比 1:1.8)、平均年齢は 51.37 歳であり、過去の報告に近似していた(11,12). 一方、多形腺腫の好発部位は耳下腺とされている(13)が、本研究では口蓋腺に発生した症例が最も多かった。これは、本研究機関が歯科を主体とする施設であることを反映した結果であると考えられる(14).

多形腺腫を構成する上皮成分と腫瘍性筋上皮細胞は様々な形態を呈する(14). 本研究では、上皮成分で最も一般的な細胞は導管上皮様細胞および腫瘍性筋上皮細胞、扁平上皮様細胞であった。上皮成分の観察頻度は大唾液腺と小唾液腺の間に差はなかった。しかし文献的に、角化を伴う扁平上皮化生の出現率は、自験例で 30.8%、Seifert らは 2.5%と自験例での出現率が極めて高かった。扁平上皮化生は、慢性物理的刺激によって生じることが知られている。本研究では口蓋腺を中心とした小唾液腺症例を対象としており、これらの唾液腺が口腔粘膜上皮と近接し、物理的刺激を受けやすいことが関与していることが推察された(15).

本研究では、Seifert 分類の束状構造を除く 5 種類の間質様構造が観察された。間質様構造は同一腫瘍内で異なる種類が混在しており、粘液腫様構造、軟骨様構造、粘液軟骨様構造の発現態度は過去の報告と同様であった(16). 各種の間質様構造の出現率は硝子化組織が最も多く、続いて線維化と粘液腫様の間質成分が多かった。これらの 3 つの間質様構造は、既知の報告(14, 17, 18)でも高頻度に観察されており、多形腺腫の代表的な間質様構造と考える。Lopes ら(14)は、硝子化および線維化が大唾液腺より小唾液腺で多くは発現していると報告しており、

本研究においても同様な所見が得られた。

本研究では、大唾液腺と小唾液腺における粘液軟骨様組織の発生頻度で差異を認めた。口蓋腺から発生した多形腺腫ではしばしば軟骨様構造や粘液腫様構造といった間質様構造が欠如していると報告されている(19)。本研究は口蓋腺を主体とする小唾液腺症例も対象であったため、軟骨様組織の発現率が低かったのではないかと考える。

本研究では、subtype 1, 2a および 2e 合わせて全体の 75.0%を占めていたことから、粘液腫様構造と硝子様構造が間質成分の主な構成成分であるといえる。Lopes ら(14)は、subtype 1 が最も多く、次いで subtype 2 が多いと報告した。また、subtype 2 の中でも線維性および硝子様組織が小唾液腺由来の多形腺腫で頻繁にみられると記載しており、自験例における傾向と同様であった。硝子化ないし線維化は慢性刺激に対する反応あるいは編成として生じることから、大唾液腺と比較して小唾液腺では、持続的な機械的刺激がより深く関与している可能性が示唆される。

本研究においては、大唾液腺は subtype 2a, 2c が多く、小唾液腺は subtype 1 が多くみられた。唾液腺は、発生部位により粘液腺、漿液腺、混合腺が存在し、かつ混合腺における漿液腺、粘液腺の比率も異なる。このような組織構築の違いが大唾液腺症例と小唾液腺症例における腫瘍構築の違いに関連している可能性がある(14)。

本研究では、再発症例は含まれていなかった。多形腺腫における Seifert 分類と予後についての関係は示されていない(4)。一方で、硝子様構造が顕著に認められる症例は悪性転化に関係するという報告もあり(20, 21)、Seifert 分類と予後との関係性に関してはさらなる検討が必要である。

Subtype	Proportion of stroma	Stromal differentiation	Epithelial differentiation
1	30-50	Mucoid	Duct and myoepithelial, epidermal cells etc.
2	80	Mucoid(2a),chondroid (2b),a mixed mucochondroid(2c),facicular(2d), fibrous/hyaline(2e)	as subtype1
3	20-30	as subtype2	as subtype1
4	20-30	as subtype2	as subtype1 with some monomorphic differentiation

Figure 1 Seifert’s classification

Fig.1 shows the classification by Seifert (1976).

Subtype 1: stroma content of 30% to 50%.

Subtype 2: stroma content of 80%.

Subtype 3, 4: stroma content of 20% to 30%.

Table 1 Clinicopathological data (104 cases)

Feature	Value
Gender	
Male	37 (35.6 %)
Female	67(64.4 %)
Age	
Mean (year)	51.37
11-20	5 (4.8 %)
21-30	11 (10.6 %)
31-40	23 (22.1 %)
41-50	16 (15.4 %)
51-60	19 (18.3 %)
61-70	13 (12.5 %)
71-80	12 (11.5 %)
>80	5 (4.8 %)
Location	
Major salivary glands	28 (26.9 %)
Parotid	16 (15.4 %)
Submandibular	12 (11.5 %)
Minor salivary glands	76 (73.1 %)
Palate	50 (48.1 %)
Buccal	15 (14.4 %)
Lip	10 (9.6 %)
Gingiva	1 (1.0 %)

Table 2 Distribution of structural component analyses (104 cases)

Structural component	Total cases	Major salivary glands	Minor salivary glands
Epithelial cell forms			
salivary duct and myoepithelial cells	98 (94.2 %)	26 (92.9 %)	72 (94.7 %)
epidermoid cells	104 (100 %)	28 (100 %)	76 (100 %)
striated duct cells	0	0	0
keratinized squamous epithelium	32 (30.8 %)	10 (35.7 %)	22 (28.9 %)
oncocytes	4 (3.8 %)	0	4 (5.3 %)
sebaceous gland cells	11 (10.6 %)	2 (7.1 %)	9 (11.8 %)
goblet cells	4 (3.8 %)	1 (3.6 %)	3 (3.9 %)
basal cells	0	0	0
Stromal component			
myxomatous	53 (51.0 %)	13 (46.4 %)	40 (52.6 %)
chondroid	2 (1.9 %)	1 (3.6 %)	1 (1.3 %)
mucochondroid	16 (15.4 %)	10 (35.7 %)	6 (7.9 %)
hyaline	59 (56.7 %)	14 (50 %)	45 (59.2 %)
fibrous	56 (53.8 %)	15 (53.6 %)	41 (53.9 %)
lipomatous	0	0	0
fascicular	0	0	0
osseous	0	0	0
calcified	1 (1.0 %)	0	1 (1.3 %)

Table 3 Histopathological classification according Seifert's subtype (104 cases)

Subtype	Total	Major salivary glands	Minor salivary glands
1	33 (31.7 %)	7	26
2a	18 (17.3 %)	8	10
2b	1 (1.0 %)	1	0
2c	12 (11.5 %)	8	4
2d	0	0	0
2e	26 (25.0 %)	3	23
3	11 (10.6 %)	1	10
4	3 (2.9 %)	0	3

第 2 章

Usefulness of SOX-10 and EGFR for pericapsular evaluation of pleomorphic adenomas (多形腺腫の被膜周囲評価における SOX-10 と EGFR の有用性)

緒言

多形腺腫の治療法としては主に切除が挙げられ、予後は良好とされる。しかし、一部の症例では再発や悪性転化の報告が存在する(3,22)。多形腺腫の再発の原因としては、患者の年齢、手術手技、多彩な間質様構造等の関与が指摘されている(22)。

多形腺腫はしばしば再発することが知られている。多形腺腫の再発の原因としては、患者の年齢、手術手技、多彩な間質様構造などの関与が指摘されている(22)。第 1 章で、Seifert らの分類に基づき小唾液腺症例を検索した結果、大唾液腺症例と同様に多彩な組織像を呈していた。

多形腺腫は被膜を有するが、被膜が不完全なことや被膜内に浸潤を認めることがあるため、病理組織学的な検索では腫瘍細胞と被膜との関係性を明らかにすることが重要である(8)。腫瘍細胞と被膜との関係性を明らかにする上で腫瘍性筋上皮細胞の評価として用いられている SOX10 と腫瘍細胞の増殖、分化といった生物学的活性に関与している EGFR を用いて評価を行うこととした。

本研究は口蓋に発生した多形腺腫の組織学的 subtype と被膜近傍の腫瘍組織との特徴、およびこれらの関連性を精査するために、病理組織学的および免疫組織化学的検索を行った。

材料および方法

1) 対象

1994年～2019年に日本大学松戸歯学部附属病院病理診断科にて口蓋に発生した病変の手術を行い多形腺腫の病理組織診断がなされた50例のうち、被膜を有し、satellite結節の存在しない44例を対象とした。本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (EC20-19-023-1号) の承認を得て実施した。

2) 材料方法

(1)病理組織標本の作製

検体は、10%ホルマリンにて浸漬固定され、通法に従いパラフィン包埋がなされた。パラフィン包埋ブロックは4 μ m厚に薄切した切片標本を作製し、HE染色を行った。

作製されたスライドガラス標本は2名の口腔病理専門医によって評価された。

(2)免疫組織化学染色

一次抗体に、抗ヒト SRY (sex determining region Y)-box 10・ウサギモノクローナル抗体 (760-4968, clone:SP267, Roche), 抗ヒト Wild-Type EGFR, DAK-H1-WT・マウスモノクローナル抗体 (M729829-8, 希釈濃度 1:100, DAKO) を用いて免疫組織化学染色を行った。抗原賦活化処理には Target Retrieval Solution pH 9 (S236784, DAKO)を使用し、112.6°Cの1.54気圧で10分間処理した。さらに、0.5% H_2O_2 メタノールで内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを室温にて15分間行った。二次抗体には EnVisionTM+ Dual Link System-HRP (K4061, DAKO) を使用した。発色基質として DAB+, liquid (K346711-2, DAKO) を用いた。対比染色には Mayer のヘマトキシリンを用いた。染色の対照として正常唾液腺組織を使用した。

3) 評価方法

作製された HE 標本を Seifert らの分類(4)を用いて 4 群に分類した (Fig.1)。更

に本研究では subtype 1 を classic type, subtype 2 を stroma rich type, subtype 3, 4 を cellular-rich type と分け 3 群で比較検討した(3,8).

免疫組織化学染色の評価は被膜の隣接領域($26293.7 \pm 6967.2 \mu\text{m}^2$)とした.

SOX10 の評価は対物レンズ 20 倍で被膜近傍の腫瘍組織を撮影し, 各症例 3 視野の腫瘍細胞の SOX10 陽性細胞率を計測し, 3 視野の平均値を各症例の値とした(23).

EGFR の評価はがんの進行や予後との関連性を評価に用いる immunoreactive score を用いて評価を行った(23).

4) 統計学的検討

SOX10 陽性細胞率は, classic type , stroma-rich type , cellular type の 3 群間で統計学的検討を行った. 統計処理における正規性の確認は BellCurve for Excel (version 4.05)を用いて, Shapiro-Wilk 検定 (有意水準 0.05), 事前比較には Kruskal-Wallis 検定 (有意水準 0.05), 事後検定に Steel-Dwass 検定 (有意水準 0.05) を行った.

結果

男性 17 名, 女性 27 名で男女比は 1 : 1.6 であった. 年代別では 20 代~70 代と幅広い年代でみられ, 50 歳代で最も多く認められた (Fig.2). HE 標本に基づき対象を Seifert 分類した結果, classic type 43.2%, stroma-rich type 43.2%, cellular type 13.6%であった (Fig.3). Classic type と stroma-rich type の 63.0%で粘液腫様構造を観察でき, そのほとんどで被膜近傍の腫瘍組織に粘液腫様構造が散見された (Fig.4).

免疫組織化学的に, 被膜近傍の腫瘍組織に SOX10 に核が陽性を示す腫瘍性筋上皮細胞が多数認められた (Fig.5). SOX10 陽性細胞率の各群の中央値 (四分位範囲), classic type 58.3 % (41.9-77.2), stroma-rich type 35.5% (20.1-55.1), cellular type 84.7% (77.4-91.6) であった. 正規性検定の結果は, classic type $p=0.187$, stroma-rich type $p=0.044$, cellular type $p<0.001$ であった. 事前比較の結果は $p<0.001$, 事後検定ではいずれの群間にも有意差を認めた ($p<0.001$) (Fig.6).

Cellular type の被膜に接した導管上皮様細胞や stroma-rich type の粘液腫様部の腫瘍性筋上皮細胞に SOX10 陽性所見を認めた. EGFR は導管上皮様細胞や扁平上皮化生を随伴する一部の腫瘍細胞の細胞膜に陽性反応を示し, 被膜近傍の腫瘍組織においては腫瘍性筋上皮細胞, 導管上皮様細胞, 扁平上皮様細胞の細胞質が陽性を呈した. また, IRS は classic type で 1-2, stroma-rich type で 0-1, cellular type で 3 を示し, cellular type で IRS が高値であった (Fig.7).

考察

本研究は、多形腺腫の被膜近傍の腫瘍組織に焦点を当てて研究を行った。Mariaら(2)は、大唾液腺と比較して小唾液腺では被膜近傍の腫瘍組織での浸潤が多く認められると報告している。そこで本研究は、局所侵襲による結節との鑑別が困難な satellite 結節を有する症例は対象から除外した。

対象症例は、臨床的に男女比 1:1.6 とやや女性に多く、20 歳代～70 歳代と幅広く認められた。これらは大唾液腺例の特徴と一致しており(24)、小唾液腺に発生する多形腺腫も大唾液腺に生じるものと同様の臨床病理学的特徴を有することが示唆された。

Seifert 分類は多形腺腫を従来の間質成分に基づき subtype 1 から subtype 4 までの 4 つに分類している。本研究では病理組織学的な検索を目的としており、腫瘍間質の割合で subtype を分ける必要がなかったため、腫瘍実質に対する腫瘍間質の占める割合が同様である subtype 3 と subtype 4 は一括して cellular type として取り扱った。そして、subtype 1 は classic type, subtype 2 を stroma-rich type とし、3 つの subtype 間で比較検討した(3, 8)。その結果、対象の subtype の内訳は、classic type が 43.2%, stroma-rich type は 43.2%, cellular type が 13.6%であった。過去の報告より、大唾液腺に発生した多形腺腫は stroma-rich type が最も多いと報告されている(3, 8)。従って、小唾液腺を対象とした本研究結果は、大唾液腺での過去の報告と大きな違いは認められなかった。

多形腺腫の再発する一因として、粘液腫様構造の存在が関与しているとされる(3)。本研究では、classic type と stroma-rich type の 63.0%で粘液腫様構造を観察できたため cellular type と比較してこれらのタイプの多形腺腫は潜在的に再発する可能性が高いと考える。また、粘液腫様構造を有する症例では、被膜近傍の腫瘍組織にも粘液腫様構造が観察される症例が多くみられた。粘液腫様構造を有する多形腺腫では、被膜を欠き腫瘍が唾液腺と結合している場合があるとの報

告もある(8). 従って、多形腺腫では、手術材料の病理組織検査において、殊に粘液腫様構造部に隣接する被膜近傍の腫瘍組織の十分な検索が重要である.

SOX10 は細胞の成長や分化を調節する SOX (SRY-related HMG-box) ファミリーに属し、転写因子としての役割を果たすことが知られている(25, 26). 正常唾液腺では、介在部導管と筋上皮細胞に SOX10 が陽性を示し、唾液腺腫瘍では介在部導管や筋上皮細胞を発生由来とする腺様嚢胞癌、筋上皮癌、基底細胞癌、多形腺腫、基底細胞腺腫などで SOX10 陽性所見を認める(26, 27). 多形腺腫では、SOX10 が腫瘍性筋上皮細胞の核に発現(26)し、本研究においても被膜近傍の腫瘍組織の腫瘍性筋上皮細胞が陽性を示した. そして、被膜近辺の腫瘍細胞の SOX10 陽性率は、Seifert 分類に基づきいずれの群間にも有意差 ($p < 0.001$) を認めたことから、Seifert 分類は被膜近辺の腫瘍性筋上皮細胞比率と深く関係している可能性が示された.

EGFR は種々の細胞で発現しており、細胞の分化、増殖といった生物学的活性に関与している(28). 一方、EGFR は遺伝子変異を起こすと、チロシンキナーゼにアデノシン三リン酸が結合することで、タンパク質が活性化して細胞増殖を起こし、上皮性悪性腫瘍の発育進展に寄与するとされている(29-31). EGFR は多形腺腫では、腫瘍性筋上皮細胞の細胞膜に局在を示す(28, 31). 本研究では EGFR は cellular type の導管上皮様細胞が陽性を呈し、stroma-rich type では、一部の導管上皮様細胞が陽性であった. IRS は、cellular type が最も高値を示したことから cellular type は他の type と比較し、生物学的活性が高い可能性が示唆された.

本研究結果から小唾液腺における多形腺腫の、殊に被膜近傍の腫瘍組織は、Seifert 分類と生物学的活性との関係性が示唆された. 特に、cellular type は、SOX10 と EGFR の染色態度に鑑み生物学的活性が高い可能性が推察された. 小唾液腺腫瘍の多形腺腫は、被膜に粘液腫様構造部が近接する場所が目立ったた

め、病理組織検査では十分な検索が必要である.

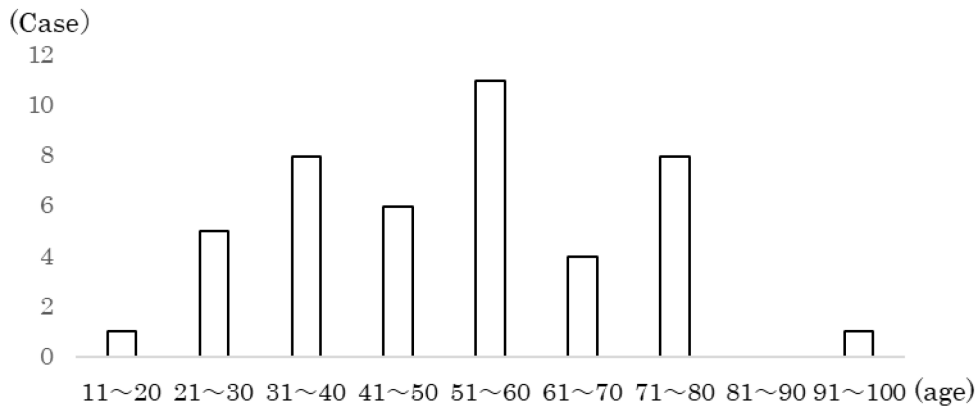


Figure 2 Age distribution

The age distribution ranged from 20s to 70s, with the largest number in their 50s.

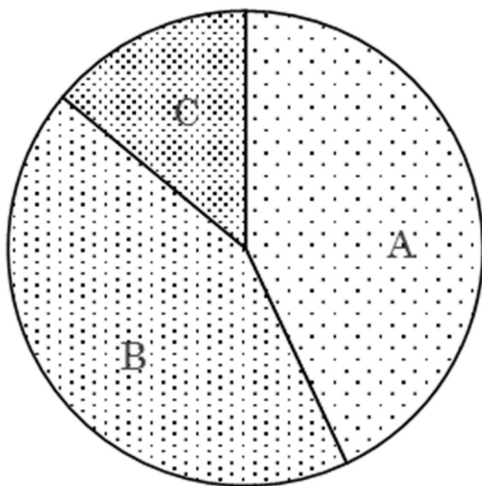


Figure 3 Breakdown of cases

A: classic type, 43.2%. B: stroma-rich type, 43.2%. C: cellular type, 13.6%.

Classic type was equal with stroma-rich type.

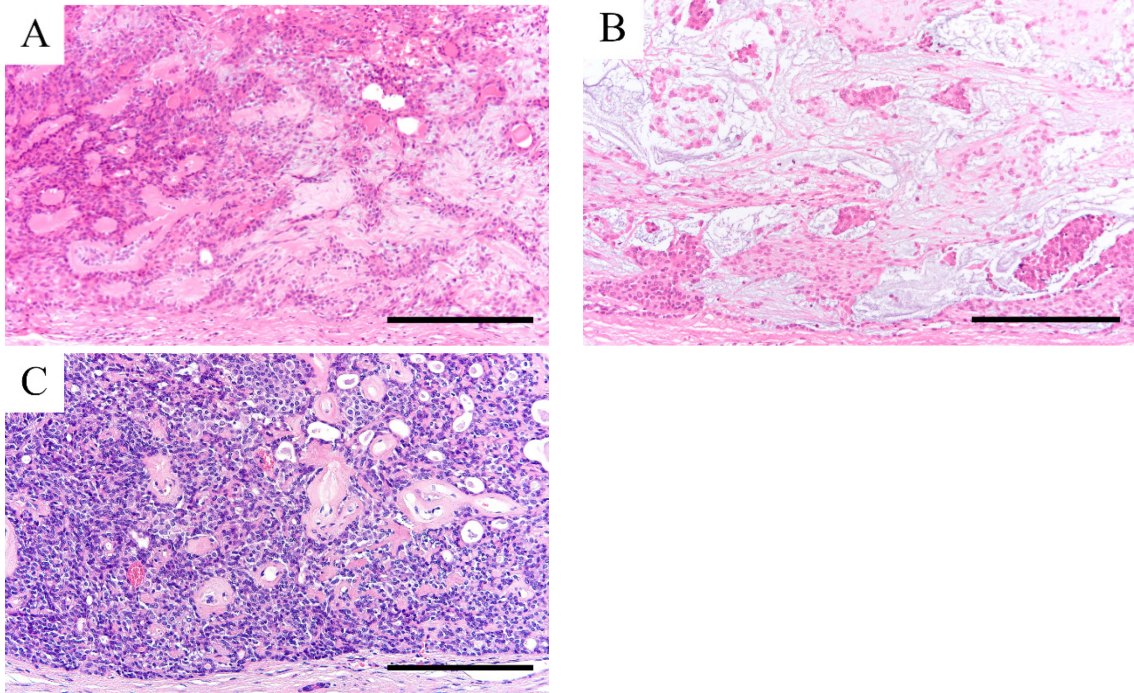


Figure 4 Histological classification (HE, $\times 20$)

A: classic type. Parenchyma and stroma are intermingled.

B: stroma-rich type. There is little parenchyma, and stroma is abundant.

C: cellular type. There is little stroma, and parenchyma is abundant.

bar = 40 μm

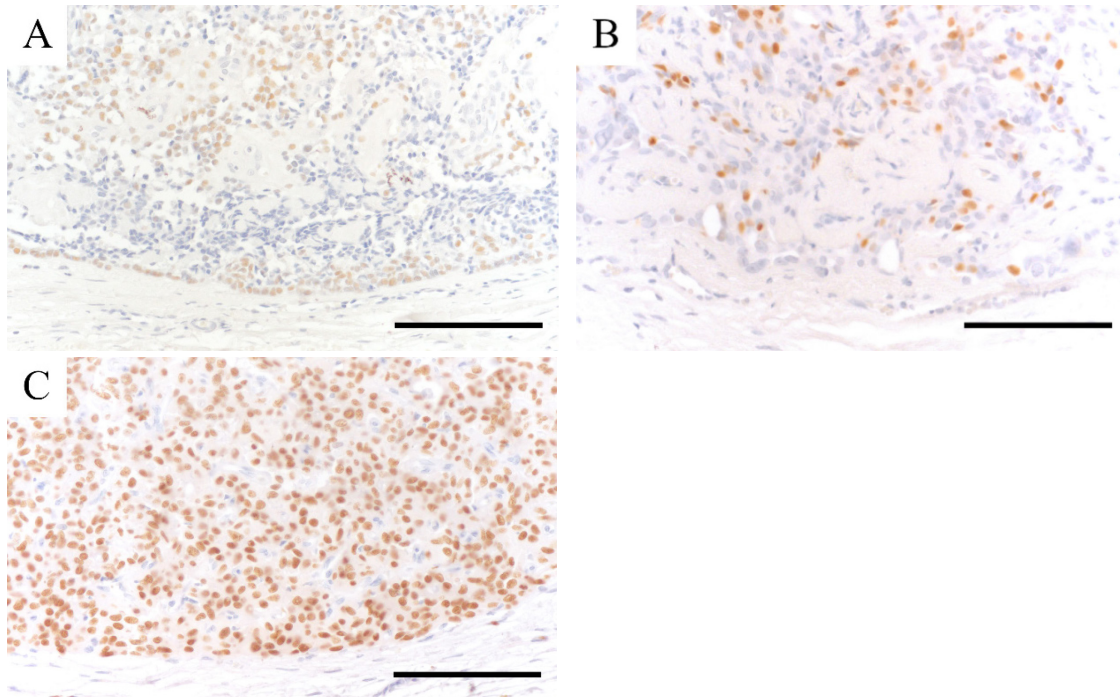


Figure 5 Immunohistochemical Staining (SOX10, ×20)

A: classic type. B: stroma-rich type. C: cellular type.

bar = 40 μm

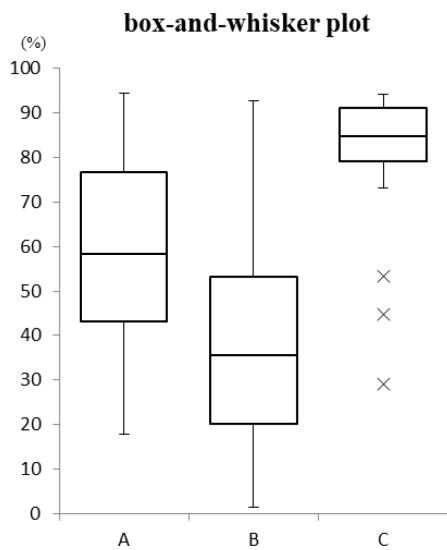


Figure 6 The median value (interquartile range) of the rate of SOX-10

A: classic type 58.3% (41.9- 77.2%). B: stroma-rich type 35.5% (20.1- 55.1%).

C: cellular type 84.7% (77.4- 91.6%).

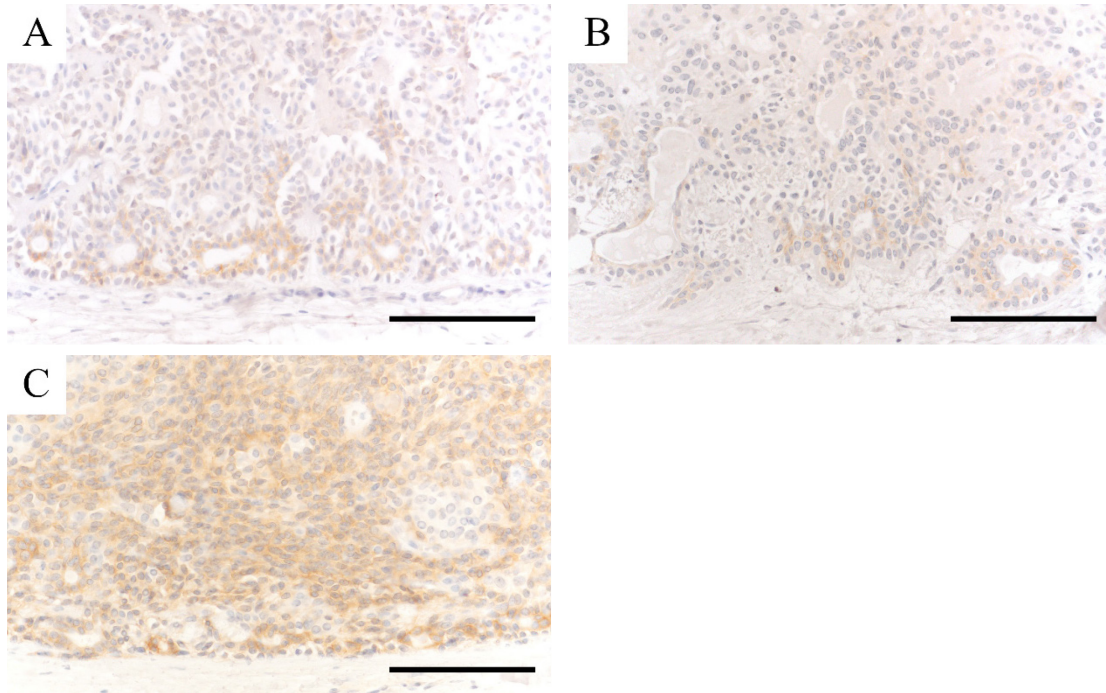


Figure 7 The IRS immunohistochemical staining (EGFR, ×20)

A: Score 1-2 in classic type. It is showing a positive reaction in the perinuclear cytoplasm.

B: Score 0-1 in stroma-rich type. It is showing a staining attitude in a small amount of cytoplasm.

C: Score 3 in cellular type. Due to undergoing dedifferentiation, it is showing a staining attitude on many cell membranes.

bar = 40 μ m

【総括】

多形腺腫において、予後に影響する因子の一つとして被膜の評価が重要である。そこで本研究は第 1 章では多形腺腫の大唾液腺と小唾液腺で比較を行い、実質（上皮成分）および間質成分の発生率、subtype 毎の割合を明らかにすることで、多形腺腫の詳細な病理組織学的特徴を明らかにすることを目的とし病理組織学的検討を行った。

これらの研究を基に第 2 章では組織学的 subtype と被膜近傍の腫瘍組織との特徴、およびこれらの関連性を精査するために、病理粗衣器乐的及び免疫組織化学的検索を行った。これらの研究から小唾液腺における多形腺腫の、殊に被膜近傍の腫瘍組織は、Seifert 分類と生物学的活性との関係性が示唆された。特に cellular type は、SOX10 と EGFR の染色態度に鑑み生物学的活性が高い可能性が示された。

参考文献

- 1) Eveson JW, Cawson RA: Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, sites, age, sex, and sex distribution. *J Pathology*, 146(1): 51-58, 1985.
- 2) Eneroth CM, Zetterberg A: Malignancy in pleomorphic adenoma. A clinical and microspectrophotometric study. *Acta Otolaryngol*, 77(6): 426-432, 1974.
- 3) Stennert E, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP, Arnold G: Histopathology of pleomorphic adenoma in the parotid gland: a prospective unselected series of 100 cases. *Laryngoscope*, 111(12): 2195-2200, 2001.
- 4) Seifert G, Langrock I, Donath K: A pathological classification of pleomorphic adenoma of the salivary glands (author's transl). *HNO*, 24(12): 415-426, 1976.
- 5) Gierek T, Majzel K, Witkowska M, Jura-Szołtys E: Analysis of 216 cases of pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Otolaryngol Pol*, 59(3): 329-332, 2005.
- 6) Paris J, Facon F, Chrestian MA, Giovanni A, Zanaret M: Pleomorphic adenoma of the parotid: histopathological study. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, 121(3): 161-166, 2004.
- 7) Mantsopoulos K, Thimsen V, Gostian AO, Müller SK, Sievert M, Iro AK, Agaimy A, Iro H: Histopathology of Parotid Pleomorphic Adenomas: A "Pleomorphic Approach" to a Demanding Lesion. *Laryngoscope*, 132(1): 73-77, 2021.
- 8) Zbären P, Stauffer E: Pleomorphic adenoma of the parotid gland: histopathologic analysis of the capsular characteristics of 218 tumors. *Head Neck*, 29(8): 751-757, 2007.
- 9) Speight PM: Update on diagnostic difficulties in lesions of the minor salivary glands. *Head Neck Pathol*, 1(1): 55-60, 2007.
- 10) Ferreira JC, Morais MO, Elias MR, Batista AC, Leles CR, Mendonça EF: Pleomorphic adenoma of oral minor salivary glands: An investigation of its neoplastic

potential based on apoptosis, mucosecretory activity and cellular proliferation. *Arch Oral Biol*, 59(6): 578-585, 2014.

11) Tian Z, Li L, Wang L, Hu Y, Li J: Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 39(3): 235-242, 2010.

12) Fonseca FP, Carvalho Mde V, de Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG, Vargas PA: Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 114(2): 230-242, 2012.

13) Adel K, El-Naggar, John K.C. Chan, Jennifer R. Grandis, Takahashi Takata Pieter J. Slootweg: WHO Classification of Head and Neck Tumours, 4th, 185-187, International Agency for Research on Cancer, 2017.

14) Lopes MLDS, Barroso KMA, Henriques ÁCG, Dos Santos JN, Martins MD, de Souza LB: Pleomorphic adenomas of the salivary glands: retrospective multicentric study of 130 cases with emphasis on histopathological features. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 274(1): 543-551, 2017.

15) Gaskin DA, Reid A, Gaskin PS: Pleomorphic adenoma with extensive squamous metaplasia: The first well-documented case involving the submandibular gland. *Hum Pathol Rep*, 27: 300600, 2022. doi./10.1016/j.hpr.2022.300600

d

16) Enescu AȘ, Enescu A, Bălășoiu M, Ciolofan MS, Căpitănescu AN: Histopathological study of pleomorphic adenoma of salivary glands. *Rom J Morphol Embryol*, 55(3): 1149-1153, 2014.

17) Mărgăritescu C, Raica M, Simionescu C, Mogoantă L, Surpățeanu M, Jaubert F, Bogdan F: Tumoral stroma of salivary pleomorphic adenoma -- histopathological, histochemical and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol*, 46(3): 211-223,

2005.

18) Ito FA, Jorge J, Vargas PA, Lopes MA: Histopathological findings of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 14(2): E57-61, 2009.

19) Eveson JW, Nagao T. Diseases of the salivary glands; in Barnes L, editor. 3rd 475-648 *Surgical pathology of the head and neck*, New York USA, 2008.

20) Auclair PL, Ellis GL: Atypical features in salivary gland mixed tumors: their relationship to malignant transformation. *Mod Pathol*, 9(6): 652-657, 1996.

21) Ethunandan M, Witton R, Hoffman G, Spedding A, Brennan PA: Atypical features in pleomorphic adenoma--a clinicopathologic study and implications for management. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35(7): 608-612, 2006.

22) Soares AB, Altemani A, de Araújo VC: Study of histopathological, morphological and immunohistochemical features of recurrent pleomorphic adenoma: an attempt to predict recurrence of pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med*, 40(4): 352-358, 2011.

23) Metindir J, Dilek GB, Pak I: Staining characterization by immunohistochemistry of tumor cancer antigen in patients with endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*, 29(5): 489-492, 2008.

24) Matsumiya-Matsumoto Y, Morita Y, Uzawa N: Pleomorphic Adenoma of the Salivary Glands and Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Med*, 11(14): 4210, 2022.

25) Ordóñez NG: Value of SOX10 immunostaining in tumor diagnosis. *Adv Anat Pathol*, 20(4): 275-283, 2013.

26) Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Biernat W, Czapiewski P, Kopczynski J, Thompson LD, Lasota J, Wang Z, Fetsch JF: Sox10--a marker for not only schwannian and melanocytic neoplasms but also myoepithelial cell tumors of soft tissue: a systematic analysis of 5134 tumors. *Am J Surg Pathol*, 39(6): 826-835, 2015.

27) Ohtomo R, Mori T, Shibata S, Tsuta K, Maeshima AM, Akazawa C, Watabe Y, Honda

- K, Yamada T, Yoshimoto S, Asai M, Okano H, Kanai Y, Tsuda H: SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis. *Mod Pathol*, 26(8): 1041-1050, 2013.
- 28) Matsubayashi S, Yoshihara T: Carcinoma ex pleomorphic adenoma of the salivary gland: an immunohistochemical study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 264(7): 789-795, 2007.
- 29) Khitab A, Alam S, Nasir S, Ali I, Hanif M, Malik M: Comparison of immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in benign and malignant salivary gland tumors. *Adv Basic Medi Sci*, 6: 3-7, 2022.
- 30) Wee P, Wang Z: Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *cancers (Basel)*, 9(5): 52-96, 2017.
- 31) Yamada K, Iwai K, Okada Y, Mori M: Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in salivary gland tumours. *Virchows Arch A Pathol AnatHistopathol*, 415(6): 523-531, 1989.

