

甲状腺濾胞性腫瘍鑑別における
甲状腺特異ペルオキシダーゼおよび Ki-67 抗体
を用いた免疫細胞（組織）化学法の有用性

山口大学大学院医学系研究科保健学専攻
生体情報検査学領域

丸田 淳子

目 次

I. 要旨	1
II. 背景	2
III. 目的	4
IV. 対象と方法	4
V. 結果	11
VI. 考察	18
VII. 結語	22
VIII. 謝辞	22
IX. 参考文献	23

I. 要旨

甲状腺濾胞性腫瘍(濾胞癌および濾胞腺腫)において甲状腺特異ペルオキシダーゼ(Thyroid specific peroxidase:TPO)とKi-67 (MIB-1)を用いた免疫細胞(組織)化学法を実施し,これらの結果と臨床病理学的所見の関連性を解析した.更に,細胞学的特徴の評価を行い,穿刺吸引細胞診での濾胞癌と濾胞腺腫との鑑別および免疫細胞化学法の有用性を検討した.

対象は野口病院にて術前に穿刺吸引細胞診を施行したのち病理組織診断の確定した濾胞性腫瘍 108 例(濾胞癌 68 例および濾胞腺腫 40 例)である.濾胞癌は,腫瘍の大部分が濾胞構造からなり低分化成分(索状,充実性,島状構造)のない 42 例(I型濾胞癌)と一部に低分化成分のある 26 例(II型濾胞癌)に分類した.また,細胞診は純形態学的に悪性像を示さない 94 例(細胞-A群)と悪性像を示す 14 例(細胞-B群)に分類した.これらの穿刺吸引標本と組織標本にて TPO 染色と Ki-67 染色 [Ki-67 Labeling index (LI)] を施行した.

その結果,細胞診の純形態学的分類では細胞-A群 94 例のうち 54 例が濾胞癌であり,細胞-B群 14 例は全て濾胞癌であった.TPO 染色は I 型濾胞癌 21.4%, II 型濾胞癌 46.2%, 濾胞腺腫 12.5%が陰性を示し,浸潤様式,リンパ節転移,遠隔転移との関係は認められなかった.また,濾胞癌のうち細胞-B群の所見を示した 14 例では,TPO 染色陰性(38.1%)が陽性(12.8%)より高頻度であった.一方,平均 Ki-67 LI は I 型濾胞癌 0.51, II 型濾胞癌 1.27, 濾胞腺腫 0.46 であった.浸潤様式とは関連性が認められなかったが,Ki-67 LI 高値は遠隔転移の存在と密接な関係が認められ,かつ細胞-B群とより緻密な関連があった.細胞-A群のうち TPO 染色陰性または Ki-67 LI が 0.62 以上の濾胞性腫瘍 38 例では 28 例(73.7%)が濾胞癌であり,その割合が高かった.濾胞癌と濾胞腺腫との鑑別において細胞診単独の感度は 20.6%であったが,TPO 染色や Ki-67 LI を併用することにより,それぞれ感度は 30.9%と 36.8%に上昇し,正診率は 50.9%と 52.8%であった.また,悪性像を示さない濾胞癌については,TPO 染色または Ki-67 LI を用いることにより正診率が 61.7%に上昇した.

以上から,Papanicolaou 染色に TPO 染色と Ki-67 染色を追加することにより,濾胞癌の検出率を改善することができ,更に悪性度の高い濾胞癌を検出できると考える.

II. 背景

甲状腺は濾胞の集合からなる臓器である。濾胞は単層の扁平な濾胞上皮細胞とそれに囲まれた濾胞腔からなる。濾胞腔内には甲状腺ホルモンを含有したコロイドを貯えており、その大きさは、性、年齢、ヨード摂取量などにより異なる。

甲状腺の病変としては、機能亢進症であるバセドウ病や機能低下症である慢性甲状腺炎（橋本病）などの他、過形成病変や濾胞上皮細胞および傍濾胞上皮細胞由来の腫瘍や非上皮性腫瘍がある。濾胞上皮細胞由来の腫瘍には、悪性の乳頭癌、濾胞癌、低分化癌、未分化癌と良性の濾胞腺腫などがある。これらの腫瘍のなかで、腫瘍細胞が主として濾胞状に増殖する濾胞癌と濾胞腺腫を合わせて濾胞性腫瘍と呼んでいる。

濾胞癌は濾胞上皮細胞由来の悪性腫瘍の 10-15%を占め、濾胞腺腫は良性腫瘍の殆どを占める¹。濾胞癌の組織学的な診断基準は、腫瘍細胞の被膜浸潤、脈管浸襲、甲状腺外への転移であり、この基準のうちいずれかを一つ以上認めることである。そのため、濾胞癌の確定診断は手術摘出後の組織標本でしか行うことができない^{2,3}。

体表に近い臓器である甲状腺は、穿刺吸引により病変部位から比較的苦痛を与えずに細胞を採取することができる。甲状腺の穿刺吸引細胞診は、高い正診率をもって組織型の推定が行えることから多くの施設で普及し、術前診断に欠かせないものとなっている。しかし、濾胞性腫瘍に関しては例外的で、細胞診では良・悪性の鑑別が困難といわれている。なぜなら、細胞診における良・悪性の判定基準は細胞集塊の構築異常と細胞の異型性であり、組織標本のように腫瘍細胞の被膜浸潤、脈管浸襲、転移を確認することができない。また、濾胞癌のなかには正常濾胞上皮細胞と区別ができないほど異型性を示さないものがある。これらの理由から、細胞診における濾胞癌の診断は殆ど不可能であると認識されている⁴。

濾胞癌は外科的手術にて摘出する必要があるが、濾胞腺腫は基本的には経過観察となっている。甲状腺癌は女性に多く、手術痕も皆無ではないことから、美容上からも不要な手術は可能な限り避けるべきである。しかし、濾胞性腫瘍は前述したように、細胞診の術前正診率が低いため、摘出術を施行して病理組織学的に確定診断をつけているのが現状である。さらに、血行性転移を示す濾胞癌はリンパ行性転移を示す乳頭癌より遠隔転移の頻度が高く、濾胞癌と乳頭癌では術式が異なる。術前に濾胞癌の診断がつけば、術式の選択のみならず、全身シンチスキャン、放射線照射、ホルモン投与などの検査・治療方針を早期に計画することができる。このような理由から濾胞癌と濾胞腺腫の術前細胞診の正診率の向上が強く望まれている。

著者は以前より、細胞学的に濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別を目的として、両者の細胞所見の比較検討を試みているが⁵⁻⁷、正診率の向上には繋がらず、未だ両者の鑑別に有効な結果は得られていない。

細胞診での判定は、出現細胞の重積性や配列、核の異型性やクロマチンの状態などの所見を基に総合的に行うため鏡検者の主観によるところが大きく、検者間差を生じる可能性がある。それらを補うために、客観的評価による細胞形態学的測定が行われている。しかし、各計測項目の重要性は、分散分析、対象を一括した因子分析や判別分析による評価に留まっておき⁸⁻²⁰、これらの解析結果や判別式が細胞学的な正診率向上にどの程度有効かは、現在のところ未知数である。

細胞診の正診率向上のための補助的手段として、種々の病変における濾胞上皮細胞の酵素活性による検討が報告されている²¹。それらの酵素として、腸管ホルモンであるインクレチンの不活化を担う Dipeptidyl aminopeptidase IV (DDP_{IV}) の定量法は、濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別に有用であるものの、標本作製や保存、染色方法などが煩雑なため一般的な普及には至っていない²²。

一方、穿刺吸引材料を用いた免疫細胞化学法は、日常業務のアルコール固定塗抹標本、既存の Papanicolaou 染色標本の脱色標本、Liquid base cytology (LBC) 標本などにて行うことが可能である。また、免疫細胞化学法による染色結果は客観的な評価ができることから、術前の細胞診診断の向上に大きく寄与する可能性がある。現在までに甲状腺疾患の鑑別の補助的手段として、甲状腺特異ペルオキシダーゼ (Thyroid specific peroxidase: TPO)²³⁻²⁵、低分子量サイトケラチン Cytokeratin19 (CK19)²⁶⁻²⁸、高分子量サイトケラチン (CK34βE12)²⁹、Hector battifora mesothelial-1 (HBME-1)^{30,31}、細胞接着因子 galectin-3^{31,32} や CD44v6³² や E-cadherin³³ および Claudin-1³⁴、CD56^{34,35}、癌抑制遺伝子 *p53*³⁶、転写調節因子 Forkhead box P3³⁷、転写因子 Pax-8³⁸、癌遺伝子 *Bcl-2*³⁸、血管内皮細胞増殖因子 Vascular endothelial growth factor (VEGF)³⁹、下垂体腫瘍形質転換遺伝子 Pituitary tumor transforming gene (PTTG)⁴⁰、Matrix metalloproteinase-2 (MMP2)⁴¹、インスリン様成長因子 Insulin-like growth factor-1⁴²、Special AT-rich binding protein 1 (SATB1)⁴³、KRAB-associated protein-1 (KAP-1)⁴⁴、細胞増殖能マーカー Ki-67 (MIB-1)⁴⁵ などが用いられてきた。これらの補助的手段を用いた解析では、乳頭癌、腺腫様甲状腺腫、慢性甲状腺炎を対象とした場合は、良・悪性の鑑別に有用である。しかし、濾胞癌と濾胞腺腫を鑑別する指標としては、両者の平均値間では統計学的有意差を認めるものの、個々の測定値はオーバーラップするものが多く、いずれも単独で用いるだけの特異性がないと言われている。

WHO分類は2004年に低分化癌という概念を提唱し、索状、充実性、島状構造の低分化成分が腫瘍の大部分を占めるものを低分化癌と定義した¹。しかし、一部に低分化成分を含むものは濾胞癌としている。つまり、WHO分類による濾胞癌には、低分化成分を含まないものと一部含むものの2群が存在する。これらの2群は生物学的悪性度に違いがあることが予想されるが、区別されることなく同一対象例として臨床病理学的な検討が行われている報告が多い。そのため、両群の臨床病理学的特徴や生物学的悪性度に関する知見が十分に解明できず、転移や予後に関する解析も殆どされていない。

Ⅲ. 目的

甲状腺濾胞性腫瘍(濾胞癌および濾胞腺腫)について、免疫細胞(組織)化学法のうちTPO⁴⁶⁻⁵⁰とKi-67^{40,51-54}の2つの抗体を用いた染色を施行し両者の染色結果と臨床病理学的所見との関連性を解析し、細胞診での濾胞癌と濾胞腺腫との鑑別における有用性を検討した。更に、WHO分類に基づいて、濾胞癌を低分化成分の有無により分類し、細胞学的特徴と免疫化学法による染色結果および臨床病理学的所見との関連性についても検討した。

Ⅳ. 対象と方法

対象

野口病院(大分県別府市)にて2003年1月から2009年12月の間に、術前の穿刺吸引細胞診が施行され、病理組織診断の確定した濾胞性腫瘍108例(濾胞癌68例、濾胞腺腫40例)について検討した。濾胞癌は、腫瘍の大部分が濾胞構造からなり低分化成分(索状、充実性、島状構造)のない濾胞癌(I型濾胞癌)42例と腫瘍の一部に低分化成分がある濾胞癌(II型濾胞癌)26例(好酸性細胞型濾胞癌4例を含む)の2群に分類した。腫瘍の大部分を低分化成分が占める低分化癌¹と濾胞型乳頭癌、異型腺腫は本研究の対象外とした。濾胞癌全例について転移と再発の追跡調査を実施しており、平均追跡調査期間±標準偏差(Standard deviation:SD)は 6.6 ± 1.3 年であった。現在までにI型濾胞癌39例(92.9%)とII型濾胞癌19例(73.1%)に再発を認めていない。詳細を表1に示す。

表 1 組織学的分類による濾胞性腫瘍の詳細

	I 型濾胞癌 n = 42	II 型濾胞癌 n = 26	濾胞腺腫 n = 40
手術時平均年齢 ± SD (歳)	50.8 ± 14.7	64.9 ± 15.5	50.7 ± 14.4
男:女	6 : 36	8 : 18	10 : 30
平均腫瘍最大径 ± SD (mm)	23.2 ± 13.1	35.9 ± 16.8	35.9 ± 13.8
術前平均血清 Tg* ± SD	2.3 ± 0.8	2.8 ± 1.0	2.1 ± 0.7

*Tg: Thyroglobulin [log₁₀(Tg)] ng/ml

細胞学的分類(純形態学的分類)

細胞学的分類は Papanicolaou 染色を施行した穿刺吸引細胞診標本で行った。不規則な配列や重積性のない濾胞構造, NC 比小, 円型核, 均一なクロマチンなどの所見を示し, 悪性像がなく細胞診では良性と判定される 94 例(細胞-A 群:図 1,2)と, 不規則な重積性配列, NC 比大, 核の高度な異型性, クロマチンの増量, 腫大した核小体などの所見を示し, 悪性像のため細胞診では悪性と判定される 14 例(細胞-B 群:図 3,4)の 2 群に分類した。

倫理的配慮

本研究は野口病院倫理委員会にて承認された。個人情報にはコード化後に解析し, プライバシーの保護には十分な配慮を行った。

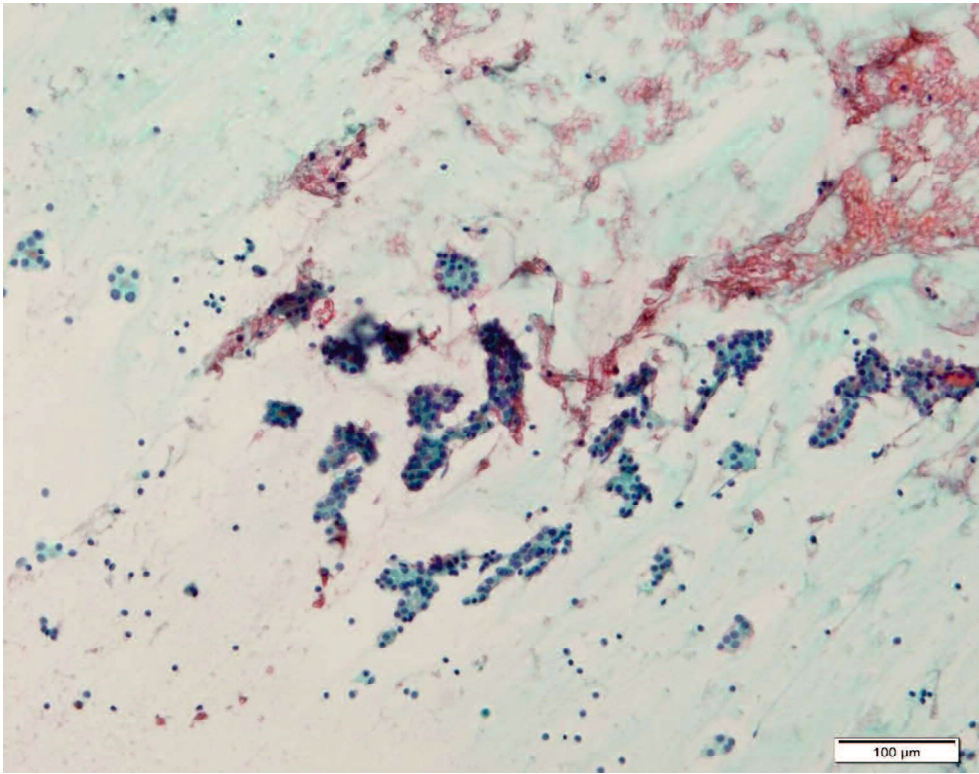


図1 細胞-A 群例, Papanicolaou 染色 (×10)

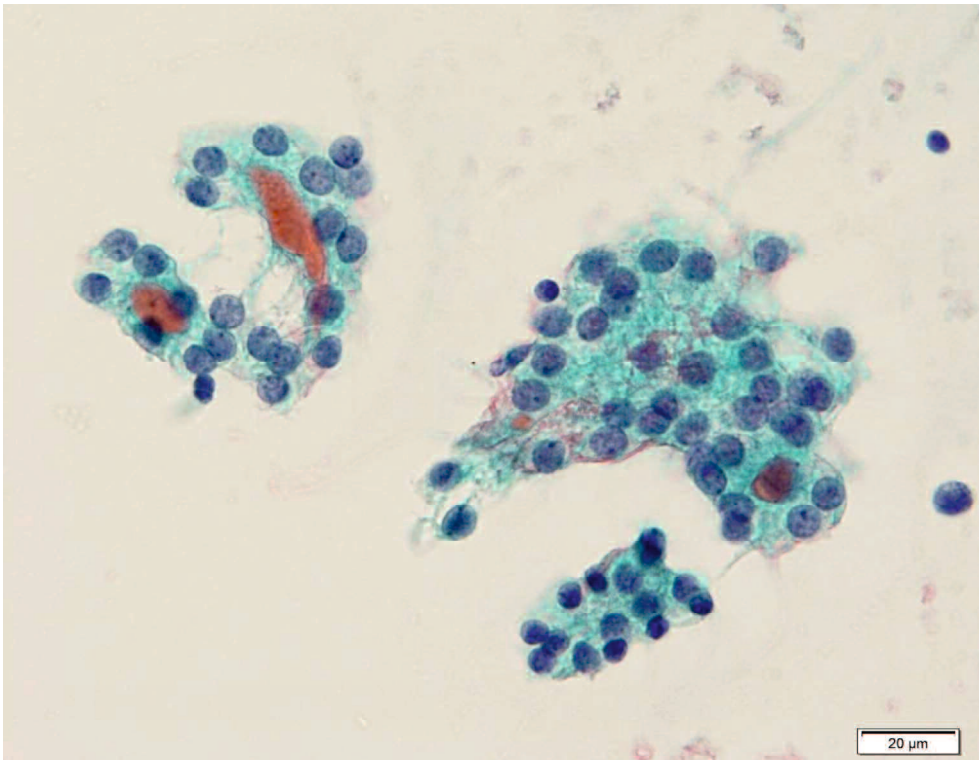


図2 細胞-A 群例, Papanicolaou 染色 (×40)

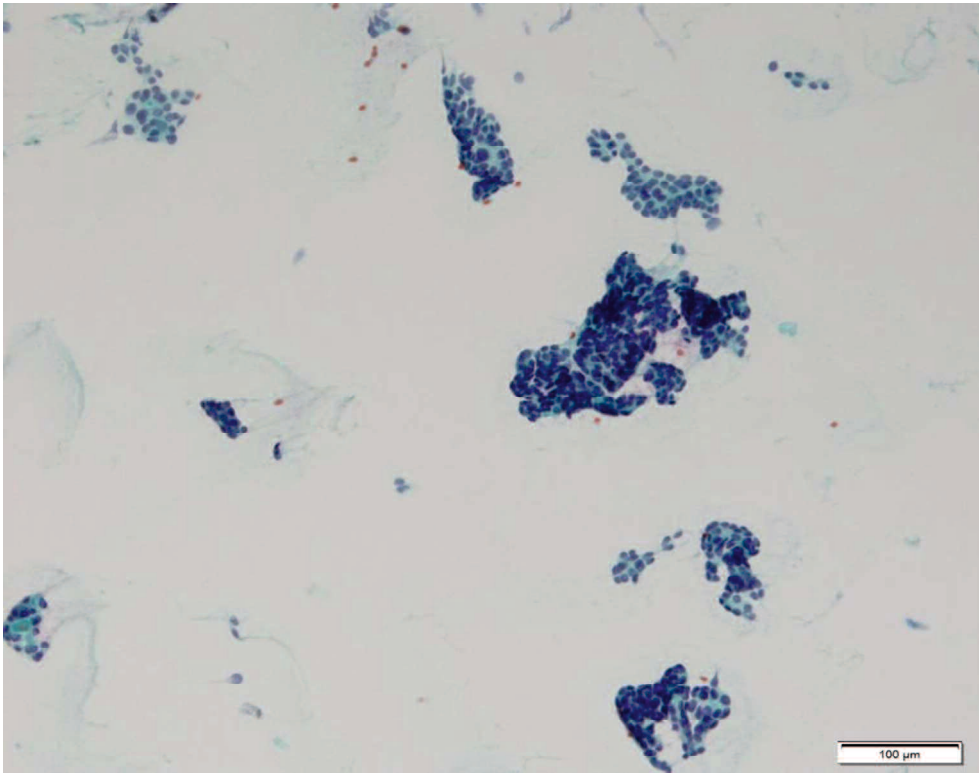


図3 細胞-B 群例, Papanicolaou 染色 (×10)

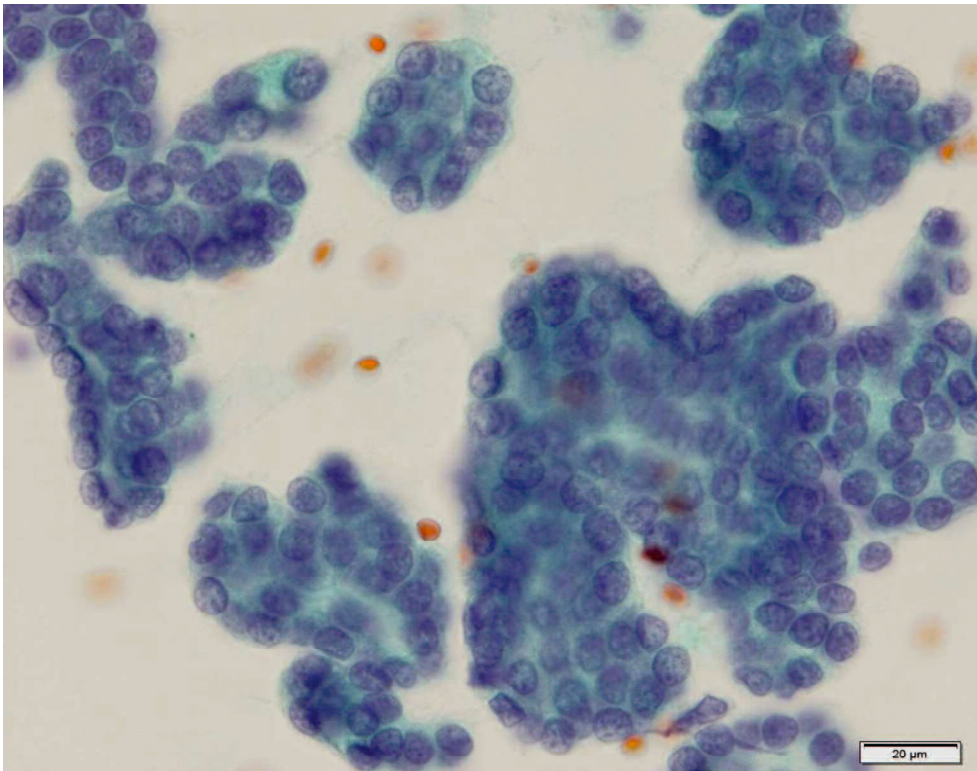


図4 細胞-B 群例, Papanicolaou 染色 (×40)

免疫細胞(組織)化学的染色法

免疫細胞化学法は95%アルコール固定した穿刺吸引標本（一部 Papanicolaou 脱色標本）で実施した。免疫組織化学法はホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの4 μ m 薄切切片を用いた。免疫染色は自動免疫染色装置 Ventana Benchmark XT (Roche, Ventana Medical System, Inc., U.S.A.) にて, streptavidin-biotin-peroxidase kit (LSAB; Ventana / VIEW DAB Universal Kit, Roche, U.S.A.) を用いて実施した。一次抗体は TPO 抗体 (clone TPO47, Biocytex, Marseilles, France, 1 : 50) と Ki-67 (MIB-1) 抗体 (clone IM505, Immunotech, Marseille, France, 1 : 100) を使用した。

TPO 染色の評価

TPO 染色の評価は, 0 (陽性細胞を認めず), 1+ (陽性細胞 <20%), 2+ (陽性細胞 21-50%), 3+ (陽性細胞 51-80%), 4+ (80% < 陽性細胞) の 5 段階でスコア一化した。諸家の報告^{45-48,54-57} から陽性細胞が 80%以上 (4+) を TPO 染色陽性とした。

Ki-67 Labeling index (LI)

Ki-67 LI は, 濾胞上皮細胞 100 個 あたり平均 Ki-67 陽性細胞数を計測値として表した^{13,17}。各症例で少なくとも 1000 個を計測して評価した。

浸潤と転移

I 型濾胞癌とII 型濾胞癌の浸潤様式と転移の有無について検討した (表 2)。

表 2 組織学的分類における浸潤と転移

		I 型濾胞癌 n = 42	II 型濾胞癌 n = 26
浸潤様式	〔 微少浸潤型	25 (59.5%)	13 (50.0%)
	〔 広汎浸潤型	17 (40.5%)	13 (50.0%)
リンパ節転移あり		2 (4.8%)	4 (15.4%)
遠隔転移あり(手術時または追跡調査中) [*]		3 (7.1%)	7 (26.9%)

^{*} $p = 0.025$, χ^2 検定

濾胞癌における細胞-A 群と細胞-B 群の浸潤様式と転移の有無を検討した (表 3)。

表 3 細胞学的分類における浸潤と転移

		細胞-A 群 n = 54	細胞-B 群 n = 14
浸潤様式	〔 微少浸潤型	32 (59.3%)	6 (42.9%)
	〔 広汎浸潤型	22 (40.7%)	8 (57.1%)
リンパ節転移あり		2 (3.7%)	4 (28.6%)
遠隔転移あり(手術時または追跡調査中) [*]		5 (9.3%)	5 (35.7%)

^{*} $p = 0.0128$, χ^2 検定

統計学的解析

濾胞性腫瘍 108 例の臨床病理学的所見（年齢、性別、血清 Tg 値、腫瘍径、浸潤、転移、再発）、細胞所見、TPO 染色結果、Ki-67 LI について解析した。穿刺吸引（細胞診）標本と組織標本における TPO 染色結果の比較は分割表の一致率と kappa statistic (κ)、Ki-67 LI は相関係数と危険率 (p) を用いた。TPO の陽性的中率 (the positive predictive value : PPV) ($PPV = \text{TPO 陰性濾胞癌例} / \text{全 TPO 染色陰性例}$) と陰性的中率 (the negative predictive value: NPV) ($NPV = \text{TPO 陽性濾胞腺腫例} / \text{全 TPO 染色陽性例}$) を求めた。Ki-67 LI の cut-off 値は感度と特異度の合計が最大となる値を求めて決定した (図 5)。Ki-67 LI の cut-off 値以上を陽性として Ki-67 LI の PPV ($PPV = \text{陽性濾胞癌数} / \text{全陽性数}$) と NPV ($NPV = \text{陰性濾胞腺腫数} / \text{全陰性数}$) を求めた。統計処理は SAS JMP 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC., U.S.A.) を用い、データの種類に応じて適宜 Students' t-test, 分散分析, Tukey-Kramer の Honestly Significant Difference 多重比較検定 (HSD test), Pearson's χ^2 検定, Tukey-Welch's 手順による分割表多重検定, ロジスティック回帰分析, 回帰分析, Kaplan-Meier 法の log-rank test を行った。

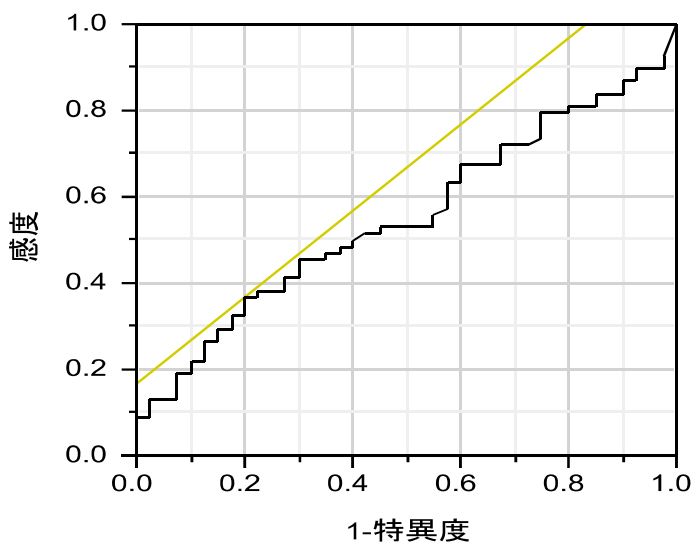


図 5 ROC 曲線を用いた Ki-67 LI の cut-off 値の設定

V. 結果

細胞学的評価

濾胞癌のうち細胞診で悪性判定したものは 20.6% (14/68) であった。一方、濾胞腺腫は細胞診で悪性判定したものはなく、全例 100% (40/40) が良性判定であった。

穿刺吸引(細胞診)標本および組織標本における免疫化学染色結果の比較

両標本における TPO 染色の一致率は 77.8% ($\kappa = 0.571$), Ki-67 LI の相関係数は 0.803 ($p < 0.0001$) であった。

TPO 染色と臨床病理学的所見

濾胞性腫瘍における TPO 染色結果は、手術時年齢、性別、腫瘍最大径と有意な関係は認められなかった(それぞれ、 $p = 0.44$ t-test, $p = 0.34$ χ^2 検定, $p = 0.26$ t-test)。血清 Tg 値が高いほど TPO 染色陰性の割合が高かった ($p = 0.02$, ロジスティック回帰分析)。

TPO 染色陰性は、I 型濾胞癌 42 例中 9 例 (21.4%) (図 6), II 型濾胞癌 26 例中 12 例 (46.2%) (図 7), 濾胞腺腫 40 例中 5 例 (12.5%) であり、TPO 染色陰性率は II 型濾胞癌が I 型濾胞癌および濾胞腺腫より有意に高かった (II 型濾胞癌と I 型濾胞癌で $p = 0.03$, II 型濾胞癌と濾胞腺腫で $p = 0.002$, I 型濾胞癌と濾胞腺腫で $p = 0.28$, χ^2 検定) (表 4)。

表 4 濾胞性腫瘍における TPO 染色結果

	TPO 染色		有意差*
	陰性	陽性	
I 型濾胞癌 n = 42	9 (21.4%)	33 (78.6%)	
II 型濾胞癌 n = 26	12 (46.2%)	14 (53.8%)	
濾胞腺腫 n = 40	5 (12.5%)	35 (87.5%)	

* Pearson's χ^2 検定 by Tukey-Welsch's closed test procedure for multiple comparison

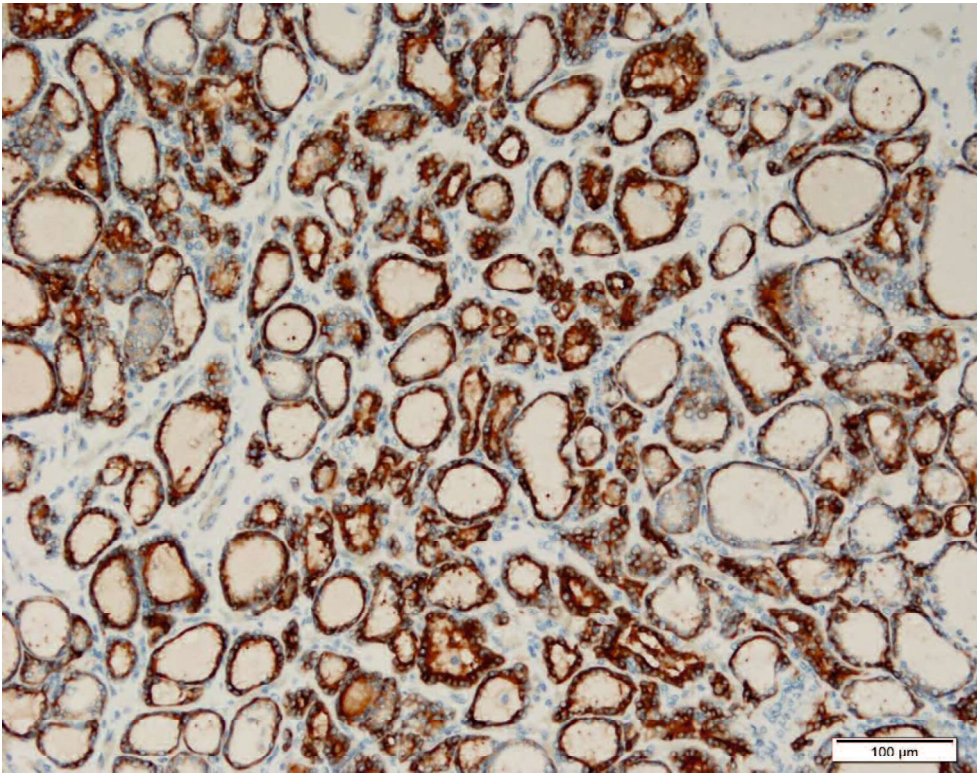


图6 I型滤泡癌, TPO 染色阳性例 (×10)

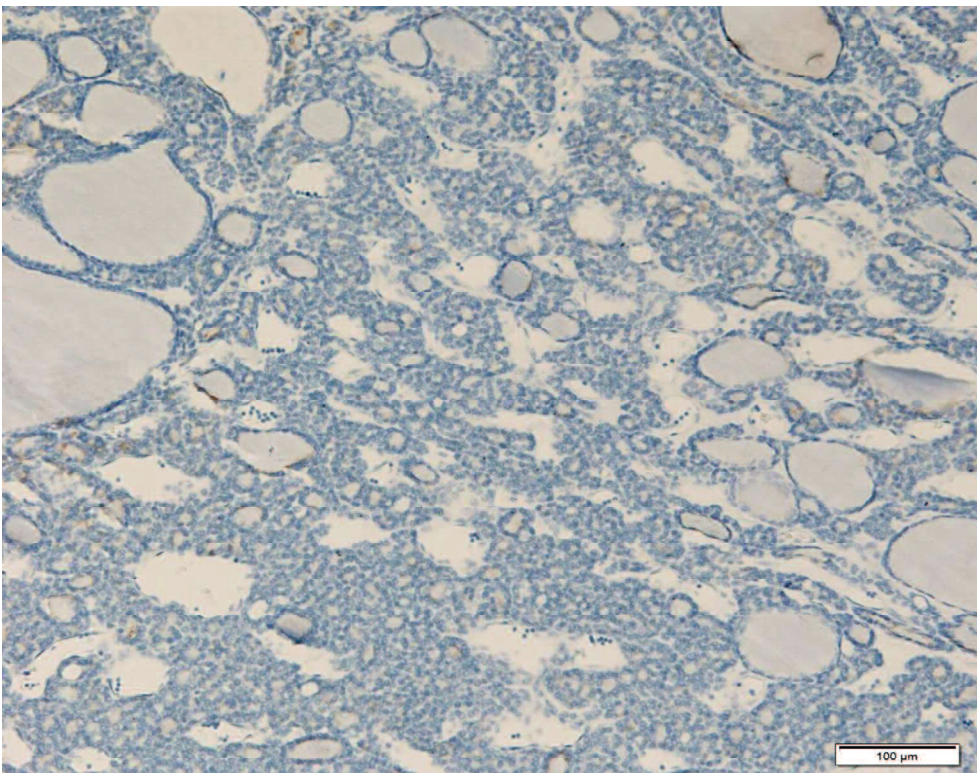


图7 II型滤泡癌, TPO 染色阴性例 (×10)

濾胞癌全体での TPO 染色陰性率は濾胞腺腫より高く, PPV は 80.8% (21/26), NPV は 42.7% (35/82) であった. TPO 染色結果と浸潤様式 ($p = 0.15$, χ^2 検定), 手術時のリンパ節転移数 ($p = 0.07$, ロジスティック回帰分析), 遠隔転移 ($p = 0.6$, χ^2 検定) の間に有意な関係は認められなかった. また, 根治手術症例 63 例における TPO 染色結果と再発率にも有意な関係は認められなかった ($p = 0.69$, log-rank test).

Ki-67LI と臨床病理学的所見

Ki-67 LI と手術時年齢, 性別, 最大腫瘍径に有意な関係は認められなかった (それぞれ $p = 0.14$ 回帰分析, $p = 0.67$ ロジスティック回帰分析, $p = 0.45$ 回帰分析). Tg が高値な症例は Ki-67LI 高値であった ($p = 0.002$, 回帰分析).

平均 Ki-67 LI \pm 標準誤差 (Standard error: SE) は, I 型濾胞癌 0.51 ± 0.10 , II 型濾胞癌 1.27 ± 0.28 , 濾胞腺腫 0.46 ± 0.07 であり, I 型濾胞癌と II 型濾胞癌 ($p = 0.0014$, HSD), II 型濾胞癌と濾胞腺腫 ($p = 0.0007$, HSD) の間で統計学的に有意差を認めた (表 5). 濾胞癌全体 0.80 ± 0.13 は濾胞腺腫との間に有意差が認められなかった ($p = 0.06$, t-test).

表 5 濾胞性腫瘍における Ki-67 LI

	平均 \pm SE	有意差 *
I 型濾胞癌 n = 42	0.51 \pm 0.10	 $p = 0.0014$
II 型濾胞癌 n = 26	1.27 \pm 0.28	
濾胞腺腫 n = 40	0.46 \pm 0.07	 $p = 0.0007$

* HSD test

Ki-67 LI の cut-off 値を 0.62 とすると PPV は 75.8% (25/33), NPV は 42.7% (32/75) であった. Ki-67 LI と浸潤様式との間に有意な関係は認められなかった ($p = 0.69$, ロジスティック回帰分析). Ki-67 LI は手術時のリンパ節転移数と弱い関連があった ($p = 0.053$, 回帰分析). Ki-67LI 値が高いほど遠隔転移との間に有意な関係が認められた ($p = 0.0018$, 回帰分析).

Ki-67 LI 値を Ki-67 LI 低値群 (0.0 - 0.49) と Ki-67 LI 高値群 (0.5 - 4.28) に分けて再発を比較すると, 根治手術症例 63 例のうち Ki-67 LI 高値群は Ki-67 LI 低値群より有意に多くの再発例があった ($p = 0.033$, log-rank test). 更に, 手術時の遠隔転移例を加えると Ki-67 LI

と再発，転移との間に密接な関係があることが明らかとなった ($p = 0.0007$, χ^2 検定) (表 6). Ki-67 LI 高値群は 28 例中 9 例 (32.1%) に手術時または術後再発あるいは遠隔転移を認めただのに対し，Ki-67 LI 低値群では 40 例中 1 例 (2.5%) しか遠隔転移を認めなかった.

表 6 濾胞癌における Ki-67 LI と遠隔転移

Ki-67 LI	遠隔転移あり [#]	遠隔転移なし [#]	有意差*
0 - 0.49 (n = 40)	1 (2.5 %)	39 (97.5 %)	} $p = 0.0007$
0.5 - 4.28 (n = 28)	9 (32.1 %)	19 (67.9 %)	

[#]手術時または追跡調査期間 * Pearson's χ^2 検定

TPO 染色結果と Ki-67 LI

濾胞性腫瘍全体では TPO 染色結果と Ki-67 LI との間に有意な関係は認められなかった ($p = 0.18$, t-test). また，I 型濾胞癌と II 型濾胞癌の間においても，TPO 染色結果と Ki-67LI の間に関連性は認められなかった (I 型濾胞癌 $p = 0.32$ t-test, II 型濾胞癌 $p = 0.89$ t-test). 濾胞腺腫では TPO 染色陰性例の平均 Ki-67 LI \pm SE は 0.85 ± 0.25 であり，TPO 陽性例の平均 Ki-67 LI 0.40 ± 0.07 より高値であった ($p = 0.043$, t-検定).

細胞診, TPO 染色, Ki-67 LI の感度と特異度および正診率

濾胞性腫瘍 108 例における細胞診, TPO 染色, Ki-67 LI の感度, 特異度, 正診率を表 7 に示す. 細胞診の純形態学的な感度は 20.6%であったが, TPO 染色と Ki-67 LI を用いると感度はそれぞれ 30.9%と 36.8%に上昇した. いずれの方法も正診率は 50.0~52.8% とほぼ同程度であった.

表 7 細胞診, TPO 染色, Ki-67 LI の感度と特異度および正診率

	感度	特異度	正診率
細胞診	20.6 % (14/68)	100 % (40/40)	50.0 % (54/108)
TPO 染色陰性を悪性とした場合	30.9 % (21/68)	87.5 % (35/40)	51.9 % (56/108)
Ki-67 LI \geq 0.62 を悪性とした場合	36.8 % (25/68)	80.0 % (32/40)	52.8 % (57/108)

細胞診で純形態学的に悪性と判定した 14 例を除いた濾胞性腫瘍 94 例を対象とした TPO 染色, Ki-67 LI の感度, 特異度, 正診率を表 8 に示す. TPO 染色と Ki-67 染色を行うことにより細胞異型を認めない濾胞癌の 51.9%を判別することが可能であった. 両染色を用いることにより正診率が 61.7%に上昇した.

表 8 細胞診にて悪性像を示さない 94 例における TPO 染色, Ki-67 LI の感度と特異度および正診率

	感度	特異度	正診率
TPO 染色陰性を悪性とした場合	24.1 % (13/54)	87.5 % (35/40)	51.1 % (48/94)
Ki-67 LI \geq 0.62 を悪性とした場合	35.2 % (19/54)	80.0 % (32/40)	54.3 % (51/94)
TPO 染色陰性または Ki-67 LI \geq 0.62 を悪性とした場合	51.9 % (28/54)	75.0 % (30/40)	61.7 % (58/94)

濾胞癌は細胞診学的に良性と判定される細胞-A 群が 54 例, 悪性と判定される細胞-B 群が 14 例であり, 濾胞腺腫は全て細胞-A 群であった. 細胞-B 群の濾胞癌の割合をみると II 型濾胞癌は 38.5% (10/26) であり, I 型濾胞癌の 9.5% (4/42) より多かった. 細胞-A 群では TPO 染色陰性が 18 例あり, そのうち 13 例 (72%) が濾胞癌 (I 型濾胞癌 9 例, II 型濾胞癌 4 例)

であった。細胞-B 群は TPO 染色陰性 (図 8) が 8 例あり, その全て (100%) が II 型濾胞癌であった (表 9)。

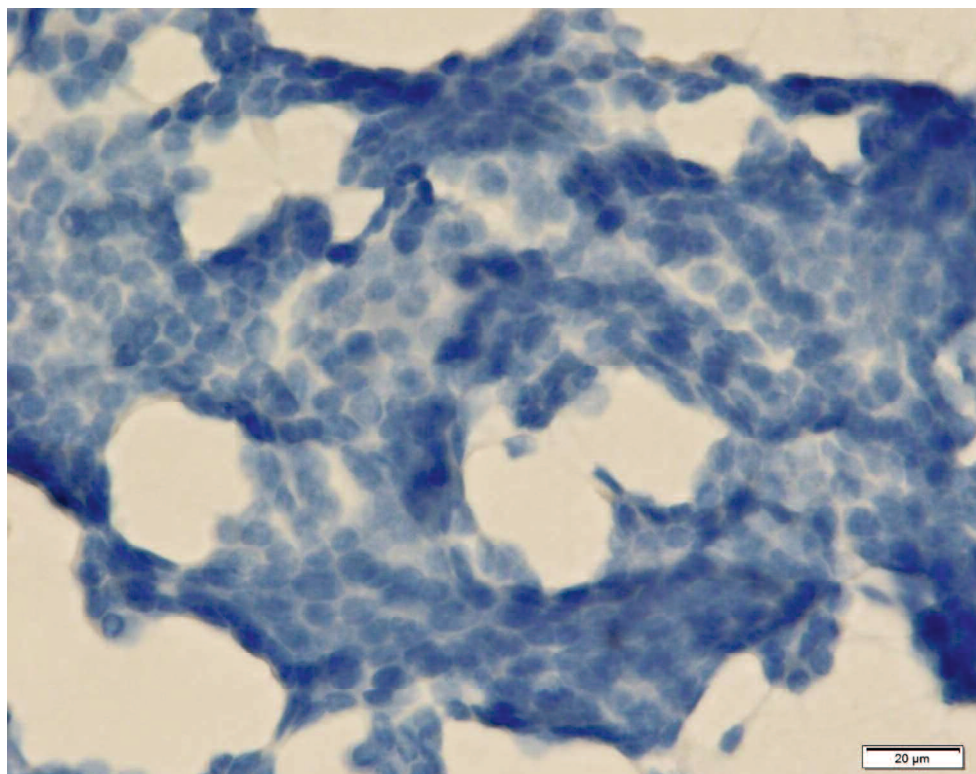


図 8 細胞-B 群, TPO 染色陰性例 (×40)

表 9 濾胞性腫瘍における組織学的分類と細胞学的分類および TPO 染色結果

	細胞-A 群 n = 94		細胞-B 群 n = 14	
	TPO 陰性	TPO 陽性	TPO 陰性	TPO 陽性
I 型濾胞癌 n = 42	9 (50.0 %)	29 (38.2 %)	0 (0 %)	4 (66.7 %)
II 型濾胞癌 n = 26	4 (22.2 %)	12 (15.8 %)	8 (100 %)	2 (33.3 %)
濾胞腺腫 n = 40	5 (27.8 %)	35 (46.0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
計	18 (100 %)	76 (100 %)	8 (100 %)	6 (100 %)

濾胞癌では, Ki-67 LI 高値の方が細胞-B 群の細胞所見を示すことが多かった ($p = 0.029$, ロジスティック回帰) (図 9, 図 10). 細胞診的に悪性像を示さない細胞-A 群 94 例のうちの 54 例 (57.4%) が濾胞癌であったが, 細胞-A 群のうち TPO 染色陰性または Ki-67 LI 0.62 以上の 38 例に絞ると 28 例 (73.7%) が濾胞癌であり, この割合は残りの細胞-A 群 (TPO 染色陽性で Ki-67 LI 0.62 未満の 56 例) 中に濾胞癌 (26 例) の占める割合 (46.2%) より有意に高かった ($p = 0.0087$, χ^2 検定).

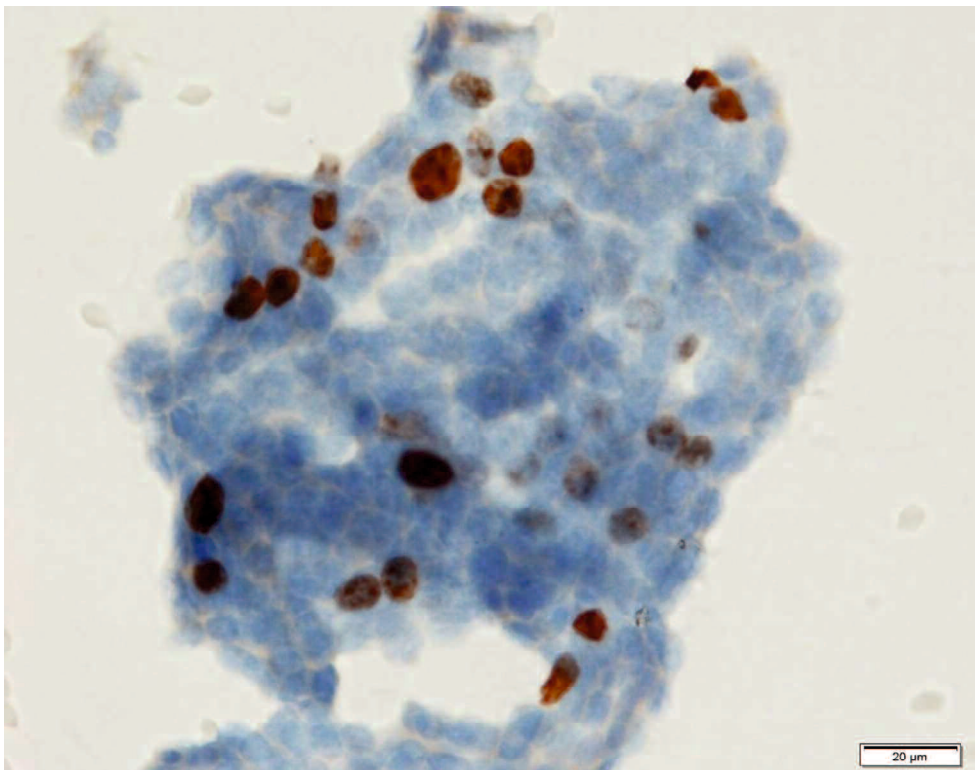
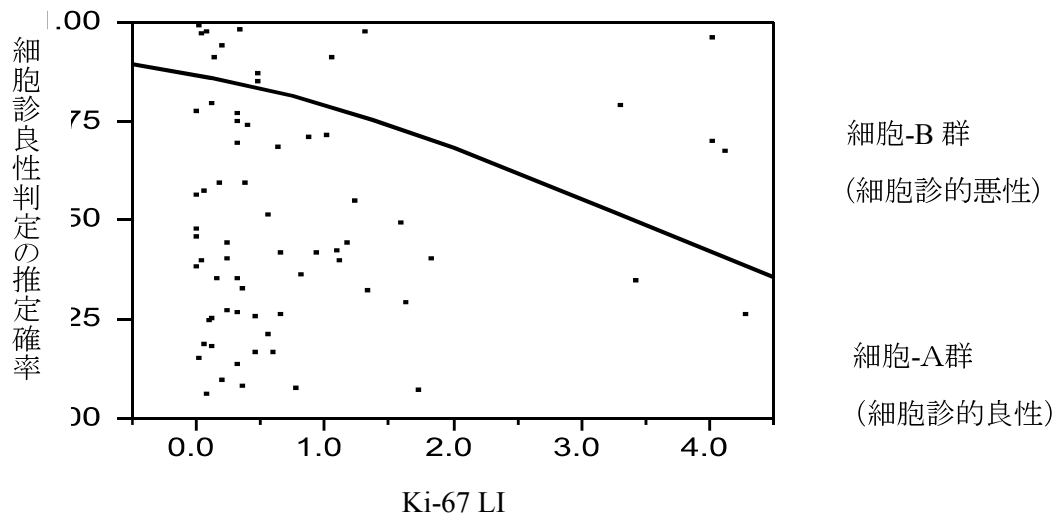


図 9 細胞-B 群, Ki-67 染色例 (x40)



ロジスティック回帰式:

$$\text{Log (probability of benign/probability of malignant)} = -0.54 (\text{Ki-67 LI}) + 1.87 (p = 0.0294)$$

図 10 濾胞癌における Ki-67 LI と細胞診判定の関係

VI. 考察

TPO は甲状腺組織特異蛋白であり、甲状腺ホルモンの生合成の際に重要な役目を果たすヘム糖蛋白の一つである²⁵。TPO 活性は濾胞上皮細胞の脱分化により消失するため、腺腫様甲状腺腫や濾胞腺腫では高く、乳頭癌や濾胞癌では低く、未分化癌では活性が認められない⁵⁵。この特性を利用して TPO 抗体を用いた免疫細胞(組織)化学法による腫瘍の良・悪性の鑑別に加えて、濾胞性腫瘍の細胞・組織学的診断への応用が試みられている^{46-50,55-61}。しかしながら、濾胞性腫瘍の鑑別に関する免疫細胞(組織)化学法を含めた補助的手段では、診断に有用である^{46,47,50,58}、不十分である^{48,49}、有用ではない⁵⁵⁻⁶¹など諸説がある。濾胞癌 68 例および濾胞腺腫 40 例を対象とした本研究では、濾胞癌の 30.9% (21/68) が TPO 染色にて陰性を示し、濾胞腺腫の 12.5% (5/40) より有意に高い割合であった。しかし、PPV は 80.8% であり、信頼できる診断を提供するには十分な値ではなく、NPV は 42.7% と低かった。この結果は一部の先行論文⁵⁷同様、TPO 染色単独では濾胞癌と濾胞腺腫を識別できないことを示唆し

ている。

WHO 分類は、低分化癌を「索状、充実性、島状構造の低分化成分が腫瘍の大部分を占め、さらに壊死や明らかな血管浸潤を伴い浸潤性に増殖するもの」と定義している¹。濾胞癌は乳頭状構造を欠き濾胞構造を主体とするが、低分化成分が腫瘍の一部あるいは優位ではないものも濾胞癌に含まれている。本研究では、濾胞癌を 2 群（I 型濾胞癌は大部分が濾胞構造を示し低分化成分がないもの、II 型濾胞癌は一部に低分化成分があるもの）に分類して TPO 染色を実施し、その染色度合を両者間で比較検討した。その結果、II 型濾胞癌の 46.2% (12/26) が TPO 染色にて陰性を示し、これは I 型濾胞癌の 21.4% (9/42) や濾胞腺腫の 12.5% (5/40) より有意に高い割合であった。一方、I 型濾胞癌と濾胞腺腫では TPO 染色の陰性率に有意差は認められなかった。また、II 型濾胞癌は I 型濾胞癌より遠隔転移や再発率が高いことが明らかとなった。すなわち、濾胞癌は生物学的悪性度の異なる群に分類することができ、TPO 発現は悪性度のある程度反映すると考えられる。本研究では、対象を細胞学的（純形態学的）な面から悪性像を示す細胞-B 群と悪性像を示さない細胞-A 群の 2 群にも分類した。濾胞癌 68 例中細胞-B 群は 14 例であり、細胞-A 群は残りの濾胞癌 54 例と全濾胞腺腫 40 例であった。異常な組織構築や細胞異型を示す箇所では TPO 活性は陰性を示し、TPO 活性と細胞異型の程度には逆相関があると報告されている^{47,50}。TPO 染色陰性の濾胞癌のうち 38.1% (8/21) が細胞-B 群であったが、TPO 染色陽性では 12.8% (6/47) が細胞-B 群であった。TPO 染色陰性で細胞-B 群であった 8 例が全て II 型濾胞癌であった。このことから TPO 染色陰性と細胞異型や悪性度とは有意な関連性が存在することが示唆された。

細胞増殖能の測定は、癌の生物学的悪性度を評価するための重要な手段の一つである。Ki-67 は細胞増殖能を評価するためのマーカーの一つで、細胞周期の G₀ 期を除く殆どの細胞で核へのラベルがみられる^{62,63}。しかしながら、Ki-67 での悪性度の評価は、未分化癌や低分化癌を除けば甲状腺腫瘍では限界があると報告されている^{51,53,64}。濾胞癌では、一般的に Ki-67 LI が低値^{45,65}で、また、その値は濾胞癌と濾胞腺腫とでオーバーラップすると報告されている^{40,52,66-68}。本研究では、濾胞癌の平均 Ki-67 LI ± SE は 0.8 ± 0.13、濾胞腺腫では 0.46 ± 0.07 であり、統計学的有意差はみられなかった。PPV は 75.8%、NPV は 42.7% であり、Ki-67 LI 単独では濾胞癌と濾胞腺腫を鑑別できなかった。しかし、濾胞癌を I 型濾胞癌と II 型濾胞癌の 2 群に分類して解析すると、I 型濾胞癌では 0.51 ± 1.0、II 型濾胞癌では 1.27 ± 0.28 であり、II 型濾胞癌の Ki-67 LI が I 型濾胞癌や濾胞腺腫より有意に高値であることが統計学的に明らかとなった。つまり、Ki-67 LI は腫瘍細胞の増殖能を表すため、II 型濾胞癌の多くが高い増殖活性を有することを示している。そのうえ、Ki-67 の発現は、濾胞癌で転移のあ

る例がない例より有意に高いことが証明されており⁴⁵, 高分化癌の Stage 分類⁵⁴ や乳頭癌の手術時遠隔転移の有無^{67,69}と Ki-67 LI の値は正の相関がある. 本研究では, Ki-67 LI が 0.5 以上の濾胞癌 28 例中 9 例 (32.1%) に遠隔転移が認められた. これに対して, Ki-67 LI が 0.5 未満の濾胞癌では遠隔転移を認めたのは 40 例中 1 例 (2.5%) のみであった. オッズ比 (9/19) / (1/39) は 18.5 と極めて高かった. このことは Ki-67 LI が 0.5 以上の場合は, 生物学的悪性度が高く, 特に遠隔転移を有する可能性があることを示している.

一般的に, 高い細胞密度, 不規則な重積性, NC 比大, 核異型, クロマチン増量, 著明な核小体などの所見は細胞学的な悪性所見として認知されている. しかし, 多くの濾胞癌では細胞の異型性に乏しいため細胞形態学的に悪性と判定できないといわれている^{6,7,70,71}. 本研究の対象症例を細胞診的(純形態学的)に判定すると, 濾胞癌の 20.6% (14/68) しか悪性判定できなかった. 細胞の核面積や縦横比などを数値化し客観的評価を行った筆者らの最近の研究⁷²では, 濾胞性腫瘍の細胞は乳頭癌や腺腫様甲状腺腫の細胞と比べそれらの計測値に差が表れにくく, また一部の濾胞癌と濾胞腺腫の計測値は近似値であった. しかし, 濾胞癌を広汎浸潤型と微小浸潤型の 2 群に分けて濾胞腺腫の計測値と比較すると, 広汎浸潤型濾胞癌は濾胞癌全体を一つにまとめた場合より濾胞腺腫との間に統計学的な有意差が存在することが明らかとなった. このことは, 広汎浸潤型濾胞癌は細胞学的に悪性の特徴を有する細胞であることを示している. すなわち, 本研究の細胞-B 群の濾胞癌は細胞-A 群の濾胞癌に比べて広汎浸潤が統計学的には有意ではないが, 高い割合で認められた事実と一致する. このような悪性細胞の特徴を示す濾胞癌は, 濾胞癌全体の一部にとどまり, 形態学的な細胞所見のみならず客観的な細胞計測値を用いても, 悪性との判定が不可能な濾胞癌が多く存在することも事実である. そのため, 細胞診の報告様式として, Bethesda system では濾胞性腫瘍に対して“濾胞性腫瘍あるいは濾胞性腫瘍疑い”と分類するに留まり, 良・悪性の判定を行わないことになっている⁷⁰. 一方, 甲状腺結節取扱い診療ガイドラインでは, 濾胞性腫瘍を“良性の可能性が高い”, “良性と悪性の中間群(境界病変)”, “悪性の可能性が高い”の 3 群に分類することを推奨している⁷³. 濾胞性腫瘍における細胞診の報告は, 細胞学的に悪性が疑われる症例と細胞異型を示さない症例とを区別して行われることが臨床的に有用ではないかと考えられる.

細胞所見のみに基づいて純形態学的に分類した細胞-A 群では 94 例中 54 例 (57.4%) が濾胞癌であったのに対し, 細胞-B 群では 14 例中 14 例 (100%) が濾胞癌であった. 今回の研究結果より, 細胞所見では悪性像を示さない細胞-A 群であっても TPO 染色陰性または Ki-67 LI が 0.62 以上の濾胞性腫瘍 38 例のうち 28 例 (73.7%) が濾胞癌であり, この指標を

良・悪性の判定基準とすると、濾胞性腫瘍中の濾胞癌の正診率を向上させることができる。すなわち、TPO 染色とKi-67 LIはそれぞれ単独では濾胞癌の鑑別能は十分とは言えないが、細胞診と組合せることは有用であると考えられる。

また、濾胞癌のうちⅡ型濾胞癌はⅠ型濾胞癌に比べて細胞異型が強く、TPO 染色陰性、Ki-67 LI 高値、遠隔転移を認める傾向を示した⁷⁴ (表 10)。

表 10 濾胞性腫瘍における組織学的分類, 細胞学的分類, 染色結果, および臨床所見のまとめ

	I 型濾胞癌 n = 42	Ⅱ型濾胞癌 n = 26	濾胞腺腫 n = 40
細胞-B 群	9.5 %	38.5 %	0 %
TPO 染色陰性	21.4 %	46.2 %	12.5 %
平均 Ki-67 LI ± SE	0.51 ± 0.10	1.27 ± 0.28	0.46 ± 0.07
遠隔転移あり*	7.1 %	26.9 %	-

* 手術時または追跡調査期間中

以上の結果より、Ⅱ型濾胞癌とⅠ型濾胞癌とは生物学的悪性度が異なり、臨床病理学的に区別して扱うべきと考えられる。本邦の甲状腺癌取り扱い規約では低分化成分が一部でもある腫瘍は低分化癌と定義し、低分化成分の量は問わないとしている⁷⁵。WHO 分類と本邦の甲状腺癌取り扱い規約での低分化癌の定義の違いは、腫瘍を占める低分化成分の割合の違いと浸潤性増殖の有無である。本研究では低分化成分の占める割合に着目して分類したⅡ型濾胞癌は、WHO 分類では濾胞癌であるが、甲状腺癌取り扱い規約では低分化癌となる。低分化癌は高分化な乳頭癌ないし高分化な濾胞癌と未分化癌との中間的な細胞形態および生物学的態度を示す癌である⁷⁴。本研究の対象例を甲状腺癌取り扱い規約に沿って再分類すると、臨床病理学的な特徴と細胞学的な分類が一致するところが多い。これらのことから WHO 分類の濾胞癌の定義は、今後議論されるべきではないかと考えられる。

本研究の対象とした濾胞癌 68 例では、細胞診のみ(純形態学的判定)の感度は 20.6%であった。TPO 染色結果を用いた場合は感度が 30.9%、Ki-67 LI では 36.8% と若干上昇した。細胞診で濾胞癌と推定できなかった濾胞性腫瘍 94 例において感度をみると、TPO 染色単独で

は24.1%, Ki-67 LI 単独では35.2% であり, TPO 染色またはKi-67 LIを用いると感度 51.9%, 正診率 61.7% であった. 言い換えると, 臨床的に濾胞性腫瘍が疑われた場合に, 穿刺吸引細胞診を実施すると濾胞癌の 20.6% が細胞学的に濾胞癌と推定され得る. 更に, 細胞診で形態学的に濾胞癌と推定できない濾胞性腫瘍に対して TPO 染色と Ki-67 染色を追加実施すると, 細胞異型のない濾胞癌の 51.9% を濾胞癌と推定することができ, 従来 of 細胞診のみの検出率より上昇する. また, 濾胞性腫瘍のうちより悪性を示す腫瘍, 例えば細胞学的に異型性が高度で, 一部に低分化成分を有し, 遠隔転移を示す濾胞癌は, TPO 染色陰性および Ki-67 LI 高値を示す傾向があることが明らかとなった.

以上の結果から, 日常業務の Papanicolaou 染色に TPO 染色および Ki-67 染色を追加することにより, 悪性度の高い濾胞癌の術前診断の向上に寄与できると考える.

VII. 結語

術前の細胞診検査業務において, Papanicolaou 染色に加えて TPO 染色および Ki-67 染色を追加することは, 濾胞癌の術前診断の向上に寄与することができる. 同時に, より悪性度の高い濾胞癌を選別することも可能である.

開示すべき利益相反はありません。

VIII. 謝辞

本研究にあたり終始ご指導, ご助言を頂きました常岡英弘教授, 高橋睦夫名誉教授ならびに野口病院院長 野口志郎先生に心より感謝いたします。

IX. 参考文献

1. Sobrinho-Simões M, Asa SL, Kroll TG, Nikiforov Y, DeLellis R, Farid P, Kitamura Y, et al. Follicular carcinoma. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editors. WHO Pathology & Genetics Tumours of Endocrine Organs. Lyon, France: IARC Press; 2004. p 67-72.
2. Goldstein RE, Netterville JL, Burkey B, Johnson JE. Implications of follicular neoplasms atypia and lesions suspicious for malignancy diagnosed by fine-needle aspiration of thyroid nodules. *Ann Surg* 2002;235:656-664.
3. 日本内分泌外科学会・日本甲状腺外科学会, 編. 甲状腺腫瘍診療ガイドライン. 金原出版:東京:2010
4. 丸田淳子, 橋本裕信, 末久友梨, 山下裕人, 野口志郎, 横山繁生. 甲状腺穿刺細胞診—濾胞性腫瘍の取り扱い—. *日臨細胞誌* 2010;49:55-60
5. Maruta J, Hashimoto H, Yamashita H, Noguchi S, Aratake Y, Ohno E, Kobayashi TK. Improving the diagnostic accuracy in thyroid follicular neoplasms: Cytological feature in fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2011;39:28-34
6. 丸田淳子. 濾胞性腫瘍の細胞像と鑑別ポイント. *日臨細胞九州誌* 2011;42:42-25
7. Gardner HA, Ducatman BS, Wang HH. Predictive value of fine-needle aspiration of the thyroid in the classification of follicular lesions. *Cancer* 1993;71:2598-2603
8. Priya SS, Sundaram S. Morphology to morphometry in cytological evaluation of thyroid lesion. *J Cytol* 2011;28:98-102
9. Wright RG, Castles H, Mortimer RH. Morphometric analysis of thyroid cell aspirates. *J Clin Pathol* 1987;40:443-445
10. Kavantzias N, Tseleni-Balafouta S, Davaris P. Computerized nuclear morphometry and quantitation of angiogenesis in thyroid neoplasms. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21:247-254
11. Boon ME, Löwhagen T, Willems JS. Planimetric studies on fine needle from follicular adenoma and follicular carcinoma of the thyroid, *Acta Cytol* 1980;24:145-148
12. Crissmas JD, Drozdowicz S, Johnson C, Kini SR. Fine needle aspiration diagnosis of hyperplastic and neoplastic follicular nodules of the thyroid. A morphometric study. *Anal Quant Cytol Histol* 1991;13:321-328
13. Słowińska-Klencka D, Klencki M, Sporny S, Lewiński A. Karyometric analysis in the

- cytologic diagnosis of thyroid lesion. *Anal Quant Cytol Histol* 1997;19:507-513
14. Artacho-Pérula E, Roldán-Villalbos R, Blanco-Gracia F, Blanco-Rodríguez A. Objective differential classification of thyroid lesions by nuclear quantitative assessment. *Histol Histopathol* 1997;425-431
 15. Murata S, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, Nakamura N, Yamashita H, et al. Morphological abstraction of thyroid tumor cell nuclei using morphometry with factor analysis. *Microsc Res Tech* 2003;61:457-462
 16. Rajesh L, Saha M, Radhika S, Das Radotra B, Rajwanshi A. Morphometric image analysis of follicular lesions of the thyroid. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:117-12
 17. Wang SL, Wu MT, Yang SF, Chan HM, Chai CY. Computerized nuclear morphometry in thyroid follicular neoplasms. *Pathol Int* 2005;55:703-706
 18. Tseleni-Balafouta S, Kavabtzas N, Paraskevakou H, Davaris P. Computerized morphometric study on fine needle aspirates of cellular follicular lesion of the thyroid. *Virchows Arch* 2004;22:433-32
 19. La Rosa GL, Cavallari V, Giuffrida D, Scimone S, La Porta GA, Maiorana MC, et al. The morphometric analysis of cell nuclei from fine needle aspirates of thyroid follicular lesions does not improve the diagnostic accuracy of traditional cytologic examination. *J Endocrinol Invest* 1990;13:701-707
 20. Fadda G, Rabitti C, Minimo C, Ieraci A, Verzi A, Bianchi A, et al. Morphologic and planimetric diagnosis of follicular thyroid lesions on fine needle aspiration cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;17:247-256
 21. Aratake Y, Kotani T, Tamura K, et al. Dipeptidyl aminopeptidase IV staining of cytological preparations to distinguish benign from malignancy thyroid disease. *Am J Clin Pathol* 1991;96:306-310
 22. Maruta J, Hashimoto H, Yamashita H, Yamashita H, Noguchi S. Diagnostic Applicability of dipeptidyl Aminopeptidase IV activity in cytological samples for differentiating follicular carcinoma from adenoma. *Arch Surg* 2004;139:83-88
 23. Taurog A, Dorris ML, Doerge DR. Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 1996;330: 24-32.
 24. De Micco C, Ruf J, Chrestian MA, Gros N, Henry JF, Carayon P. Immunohistochemical study of thyroid peroxidase in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissues.

- Cancer 1991; 67:3036-3041.
25. De Micco C, Zoro P, Garcia S, Skoog L, Tani EM, Caravon P, Henry JF. Thyroid peroxidase immunodetection as a tool to assist diagnosis of thyroid nodules on fine-needle aspiration biopsy. *Eur J Endocrinol* 1994;131:474-479.
 26. Cui W, Sang W, Zheng S, Ma Y, Liu X, Zhang W. Usefulness of cytokeratin-19, galectin-3, and Hector battifora mesothelial-1 in the diagnosis of benign and malignant thyroid nodules. *Clin Lab* 2012;58:673-680
 27. Isic Dencic T, Cvejic D, Paunovic I, Havelka M, Savin S. Cytokeratin19 expression discriminates papillary thyroid carcinoma from other thyroid lesions and predicts its aggressive behavior. *Med Oncol* 2013;30:362. doi: 10.1007/s12032-012-0362-1.
 28. Bose D, Das RN, Chatterjee U, Banerjee U. Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2012;33:107-111
 29. Atik E, Guray M, Gunesacar R, Ozgur T, Canda T. Immunohistochemical analysis of thyroid follicular neoplasms and BRAF mutation correlation. *India J Cancer* 2014;51:63-68
 30. Abd-El Raouf SM, Ibrahim TR. Immunohistochemical expression of HBME-1 and galectin-3 in the differential diagnosis of follicular-derived thyroid nodules. *Pathol Res Pract* 2014;doi;10.1016/j.prp.2014.06.010.
 31. Nechifor-Boilă A, Cătană R, Loghin A, Radu TG, Borda A. Diagnostic value of HBME-1, CD56, Galectin-3 and Cytokeratin-19 in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumors of uncertain malignant potential. *Rom J Morphol Embryol* 2014;55:49-56
 32. Maruta J, Hashimoto H, Yamashita H, Yamashita H, Noguchi S. Immunostaining of galectin-3 and CD44v6 using fine needle aspirate for differentiating follicular carcinoma from adenoma. *Diagn Cytopathol* 2004;36:392-396
 33. Ozolins A, Narbutis Z, Strumfa I, Volanska G, Stepanovs K, Gardovskis J. Immunohistochemical expression of HBME-1, E-cadherin, and CD56 in the differential diagnosis of thyroid nodules. *Medicina(Kaunas)* 2012;48:507-514
 34. Abd El Atti RM, Shash LS. Potential diagnostic utility of CD56 and claudin-1 in papillary thyroid carcinoma and solitary follicular thyroid nodules. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2012;24:175-84. doi: 10.1016/j.jnci.2012.10.002.
 35. Mokhtari M, Eftekhari M, Tahririan R. Absent CD56 expression in papillary thyroid carcinoma: A finding of potential diagnostic value in problematic cases of thyroid pathology.

J Res Med Sci 2013;18:1046-1050

36. Marcello MA, Morari EC, Cunha LL, De Nadai Silva AC, Carraro DM, Carvalho AL, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. P53 and expression of immunological markers may identify early stage thyroid tumors. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:846584. doi: 10.1155/2013/846584
37. Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67:483-488
38. Puglisi F, Cesselli D, Damante G, Pellizzari L, Beltrami CA, Di Loreto C. Expression of Pax-8, p53 and bcl-2 in human benign and malignant thyroid diseases. *Anticancer Res* 2000;20:311-316
39. Campos M, Ducatelle R, Kooistra HS, Rutteman G, Duchateau L, Polis L, Daminet S. Immunohistochemical expression of potential therapeutic targets in canine thyroid carcinoma. *J Vet Intern Med* 2014;28:564-570
40. Cui W, Liu X, Zheng S, Ma Y, Lie X, Zhang W. The use of a combination of Ki-67, Galectin-3, and PTTG can distinguish the benign and malignant thyroid tumor. *Clin Lab* 2012;58:419-426
41. Wu G, Zhou Y, Li T, Guo J, Zhou Z. Immunohistochemical levels of matrix metalloproteinase-2 and CD44 variant 6 protein in the diagnosis and lateral cervical lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma. *J Int Med Res* 2013;41:816-824. doi: 10.1177/0300060513481923
42. Liu YJ, Qiang W, Shi J, Lv SQ, Ji MJ, Shi BY. Expression and significance of IGF-1 and IGF-1R in thyroid nodules. *Endocrine* 2013;44:158-164. doi: 10.1007/s12020-012-9864-z.
43. Muroso S, Tsuji A, Endo K, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T. Immunohistochemical detection of SATB1 is independent of thyroid cancer differentiation. *Laryngoscope* 2013;123:2909-2912
44. Martins MB, Marcello MA, Morari EC, Cunha LL, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Clinical utility of KAP-1 expression in thyroid lesions. *Endocr Pathol* 2013;24:77-82. doi: 10.1007/s12022-013-9245-z
45. Aiad HA, Bashandy MA, Abdou AG, Zahran AA. Significance of AgNORs and ki-67 proliferative markers in differential diagnosis of thyroid lesions. *Pathol Oncol Res*

2013;19:167-175. doi: 10.1007/s12253-012-9565-1

46. Henry JF, Denizot A, Porelli A, Villafane M, Zoro P, Garcia S, De Micco C. Thyroperoxidase immunodetection for the diagnosis of malignancy on fine-needle aspiration of thyroid nodules. *World J Surg* 1994;18:529-534.
47. De Micco C, Vasko V, Garcia S, Zoro P, Denizot A, Henry JF. Fine-needle aspiration of thyroid follicular neoplasm: Diagnostic use of thyroid peroxidase immunocytochemistry with monoclonal antibody 47. *Surgery* 1994;116:1031-1035.
48. Pluot M, Faroux MJ, Flament JB, Patey M, Theobald S, Delisle MJ. Quantitative cytology and thyroperoxidase immunochemistry: new tools in evaluating thyroid nodules by fine-needle aspiration. *Cancer Detect Prev* 1996;20:285-293.
49. Faroux MJ, Theobald S, Pluot M, Patey M, Menzies D. Evaluation of the monoclonal antibody antithyroperoxidase MoAb47 in the diagnostic decision of cold thyroid nodules by fine-needle aspiration. *Pathol Res Pract* 1997;193:705-712.
50. Garcia S, Vassko V, Henry JF, De Micco C. Comparison of thyroid peroxidase expression with cellular proliferation in thyroid follicular tumors. *Thyroid* 1998;8:745-749.
51. Pujani M, Arora B, Pujani M, Singh SK, Tejwani N. Role of Ki-67 as a proliferative marker in lesions of thyroid. *Indian J Cancer* 2001;47:304-307.
52. Heikkilä A, Siironen P, Hagström J, Heiskanen I, Sankila R, Louhimo J, Haglund C, Arola J. Follicular thyroid neoplasm: Clinicopathologic features suggesting malignancy. *APMIS* 2010;118: 846-854.
53. Lacoste-Collin L, d'Aure D, Bérard E, Rouquette I, Delisle MB, Courtade-Saïdi M. Improvement of the cytological diagnostic accuracy of follicular thyroid lesions by the use of the Ki-67 proliferative index in addition to cytokeratin-19 and HBME-1 immunomarkers: a study of 61 cases of liquid-based FNA cytology with histological controls. *Cytopathology* 2014: doi: 10.1111/cyt.12128.
54. Müssig K, Wehrmann T, Dittmann H, Wehrmann M, Uberberg B, Schulz S, Bares R, Petersenn S. Expression of the proliferation marker Ki-67 associates with tumour staging and clinical outcome in differentiated thyroid carcinomas. *Clin Endocrinol* 2012;77:139-145.
55. Lima MA, Gontijo VA, Santos MC, Schmitt FCL. Thyroid peroxidase expression in

- diseased human thyroid glands. *Endocr Pathol* 1999;10:223-228.
56. Savin S, Cvejic D, Isic T, Paunovic I, Tatic S, Havelka M. The efficacy of the thyroid peroxidase marker for distinguishing follicular thyroid carcinoma from follicular adenoma. *Exp Oncol* 2006;28:70-74.
 57. Savin S, Cvejic D, Isic T, Petrovic I, Paunovic I, Tatic S Havelka M. Thyroid peroxidase immunohistochemistry in differential diagnosis of thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2006; 17:53-60
 58. De Micco C, Savchenko V, Giorgi R, Sebag F, Henry JF. Utility of malignancy markers in fine-needle aspiration cytology of thyroid nodules: comparison of Hector Battifora mesothelial antigen-1, thyroid peroxidase and dipeptidyl aminopeptidase IV. *Br J Cancer* 2008;98:818-823.
 59. Weber KB, Shroyer KR, Heinz DE, Nawaz S, Said MS, Haugen BR. The use of a combination of galectin-3 and thyroid peroxidase for the diagnosis and prognosis of thyroid cancer. *Am J Clin Pathol* 2004;122:524-531.
 60. Savin S, Cvejic D, Isic T, Paunovic I, Tatic S Havelka M. Thyroid peroxidase and galectin-3 immunostaining in differentiated thyroid carcinoma with clinicopathologic correlation. *Hum Pathol* 2008;39:1656-1663.
 61. Paunovic I, Isic T, Havelka M, Tatic S, Cvejic D, Savin S. Combined immunohistochemistry for thyroid peroxidase, galectin-3, CK19 and HMBE-1 in differential diagnosis of thyroid tumors. *APMIS* 2012;120:368-379.
 62. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67. Its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17:489-503.
 63. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168:357-363.
 64. Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV. Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Modern Pathol* 1998;11:169-174.
 65. Wallin G, Bäckdahl M, Christensson B, Grimelius L, Auer G. Nuclear protein content and Ki-67 immunoreactivity in nonneoplastic and neoplastic thyroid cells. *Anal Quant Cytol*

- Histol 1992;14: 296-303.
66. Królicka A, Kobierzycki C, Pula B, Podhorska-Okołów M, Pietrowska A, Rzeszutko M, Rzeszutko W, Rabczyński J, Domosławski P, Wojtczak B, Dawiskiba J, Dziegiel P. Comparison of metallothionein (MT) and Ki-67 antigen expression in benign and malignant thyroid tumors. *Anticancer Res* 2010;30:4945-4949.
 67. Sofiadis A, Tani E, Foukakis T, Kjellman P, Skoog L, Hoog A, Wallin G, Zedenius J, Larsson C. Diagnostic and prognostic potential of MIB-1 proliferation index in thyroid fine needle aspiration biopsy. *Int J Oncol* 2009;35:369-374.
 68. Tan A, Etit D, Bayol U, Altinel D, Tan S. Comparison of proliferating cell nuclear antigen, thyroid transcription factor-1, Ki-67, p63, p53 and high-molecular weight cytokeratin expressions in papillary thyroid carcinoma, follicular carcinoma, and follicular adenoma. *Ann Diagn Pathol* 2011; 15:108-116.
 69. Ito Y, Miyauchi A, Kakudo K, Hirokawa M, Kobayashi K, Miya A. Prognostic significance of Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2010;34:3015-3021.
 70. 樋口観世子, 廣川満良, 佐々木栄司, 丸田淳子, 越川卓, 加藤良平, 覚道健一, 坂本穆彦, 宮内昭. 甲状腺細胞診濾胞性腫瘍における診断アルゴリズムと報告様式の提案. *日臨細胞誌* 2014;53: 264-270
 71. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology : definitions, criteria, and explanatory notes edited by Cyed Z. Ali, Edmund S. Cibas. Springer, 2010
 72. 丸田淳子, 橋本裕信, 野口仁志, 常岡英弘, 高橋睦夫. 甲状腺病変における細胞形態学的計測による検討. *日臨細胞誌* 2014;53:182-189
 73. 甲状腺外科研究会, 編. 甲状腺癌取り扱い規約.第6版. 金原出版:東京:2005
 74. Maruta J, Hashimoto H, Yamashita H, Noguchi H, Noguchi S, Kobayashi KT, Tsuneoka H, Takahashi M. Value of thyroid specific peroxidase and Ki-67 stains in preoperative cytology for thyroid follicular tumors. *Diagn Cytopathol* 2014;doi:10.1002/dc.23204
 75. 日本甲状腺学会, 編. 甲状腺結節取扱い診療ガイドライン. 南江堂:東京:2013