研 究

鼻副鼻腔粘膜における複合糖質

—正常, 腫瘍について—

金 春順・大石 公子・鶴飼幸太郎

坂倉 康夫・矢谷 隆一*

Glycoconjugates in Normal Nasal and Maxillary Mucosa and Neoplasms

Jin Chun Shun, Kimiko Ohishi, Kotaro Ukai,
Yasuo Sakakura and Ryuichi Yatani

(Mie University)

Glycoconjugates in the nasal and maxillary mucosa of normal controls and of patients with inverted papilloma, epithelial dysplasia and carcinoma were studied by the lectins-HRP staining method. Four kinds of lectin were used: WGA, PNA, UEA-1, and RCA.

1. Control nasal epithelium reacted to WGA and UEA-1. Some sugar residues stained with WGA, PNA, UEA-1 and RCA were detected in various amounts in the goblet cells and mucous cells of the subepithelial glands. Serous cells in the glands were stained by UEA-1.
2. There was a similarity of WGA and UEA-1 staining in inverted papilloma, epithelial dysplasia, and control epithelium.
3. Adenoid cystic carcinoma was not stained by any of the lectins. According to cellular differentiation, Squamous cell carcinoma showed various staining patterns depending on the degree of differentiation.
4. Lectin staining may be a useful marker in the early diagnosis and cell differentiation of nasal and maxillary carcinomas.

Key words: glycoconjugates, lectin, naso-maxillary mucosa, inverted papilloma, squamous cell carcinoma

はじめに

近年, 細胞の分化, 加齢, 変性, 悪性化等の過程で, 細胞や組織を構成する複合糖質の糖鎖構造の変化が注目されている. こうした糖鎖の変化は, 特定の糖構造と特異的に結合する糖結合性蛋白質であるレクチンを用いて組織細胞化学的に解析することができる¹⁾. 今回, われわれは糖結合特異性の異なる 4 種類のレクチンを用いて, 正常ヒトの鼻副鼻腔粘膜を対照として鼻腔, 上顎洞腫瘍における複合糖質の分布とその変化を Horseradish Peroxidase (HRP) 標識法により光顕的に比較検討し, さらに悪性病変に対する本染色の有用性に検討を加えた.

材料および方法

1. 試料: 正常下鼻甲介粘膜は喉頭病変や中耳炎症例などから鼻疾患のない症例を選び患者の了解をえて全身麻酔下手術時に採取した 6 例と, 明らかな鼻疾患の既往のない剖検屍体から採取した肉眼的に正常と思われるもの 4 例を用いた. 正常上顎洞粘膜は剖検屍体から採取した 10 例を用いた. 鼻腔, 副鼻腔腫瘍は手術摘出標本 28 例を用いた. すなわち, 乳頭腫 (inverted papilloma) 4 例, 異形成 (dysplasia) 3 例, 腺様嚢胞癌 4 例, 扁平上皮癌 17 例である.

2. レクチン: 糖特異性の判明している wheat germ agglutinin (WGA), Peanut agglutinin (PNA), Ulex europeus agglutinin (UEA-1), Ricinus communis agglutinin (RCA) の 4 種類の HRP 標識レクチン (EY-laboratories 社製) を用いた (表 1).

3. 染色: 各種固定液 (カルノア液, 10% 中

性ホルマリン液, 10%ホルマリン液) によるレクチン結合様式の差異の有無をあらかじめ検討した結果, 原則として中性ホルマリンにて固定した. 固定試料によりパラフィン包埋薄切切片 (厚さ 4 μ m) を作製し, 脱パラフィン後 HRP 標識レクチンを用い染色した. まず, 0.3% H_2O_2 -メタノールで内因性ペルオキシダーゼを抑制したのち, 10% Bovine serum albumin-PBS でレクチンの非特異的反応を防ぐための処理を行った. その後, 50 μ g/ml の HRP 標識レクチンを室温にて 30 分反応させ, Dulbecco's PBS で洗浄した. ついで, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて発色させたのち, 水洗した. その後, メチルグリーンあるいはヘマトキシリンにて, 核染色, 水洗, 脱水及び封入した. 対照として, それぞれのハプテン糖を各 0.2M の濃度にて処理したレクチンを使用し, それらの特異性を見るものと, 内因性ペルオキシダーゼをブロックしたのち, レクチンを反応させず DAB 反応を行ったものを同時に染色して比較検討した.

4. 定量的観察法: 検鏡は 200 倍率で行い, 各標本毎で全視野の杯細胞と腺細胞における各レクチン反応の陽性率を求めた.

5. 扁平上皮癌の分化度: 扁平上皮癌の分化度は光学顕微鏡的病理組織学的に著者の 1 人 (RY) が判定した.

結 果

各個体間, 各種固定液による差異は, レクチン結合パターンに関する限りほとんど認められなかった.

表 1 本研究で用いたレクチン

レクチン (略称)	主 な 結 合 糖	結合阻害に用いる糖
WGA	N-アセチル-D-グルコサミン シアル酸	N-アセチル-D-グルコサミン
PNA	D-ガラクトース N-アセチル-D-ガラクトサミン	ラクトース
UEA-1	L-フコース	L-フコース
RCA	D-ガラクトース	D-ガラクトース

1. 対照実験

対照実験として特異的阻害糖の添加と内因性ペルオキシダーゼを阻害した後 DAB 反応のみを行うといずれの場合にも陽性反応は認められなかった。

2. 正常下鼻甲介粘膜

(1)WGA: 上皮層はびまん性に軽染し、杯細胞の約25%が反応陽性を示した。鼻腺の粘液細胞は約20~50%に反応陽性であった。

(2)PNA: 約25~50%の杯細胞と粘液細胞に反応産物が観察された。しかし、杯細胞以外の上皮細胞には染色性がみられなかった。

(3)UEA-1: 上皮層にびまん性反応を認めた。大多数の杯細胞と粘液細胞にも強い反応を認めたほか、血管内皮と基底膜、また若干の漿液細胞にも陽性反応を観察した(図1)。

(4)RCA: 約半数の杯細胞以外に上皮細胞の反応を認めなかった。固有層の鼻腺では、多数の粘液細胞に陽性反応が認められ、固有層も全体に軽染された。

3. 正常上顎洞粘膜

上顎洞粘膜は鼻粘膜に比し、上皮固有層の分泌腺は少数だが、杯細胞が比較的多い。

(1)WGA: 約25%の杯細胞に陽性反応を認め、少数の腺細胞が染色性を示した。

(2)PNA: 約半数の杯細胞と若干の腺細胞に反応が観察された(図2)。

(3)UEA-1: 多数の杯細胞および腺細胞に強い陽性反応があり、粘膜表面の粘液と血管内皮にも反応が陽性であった(図3)。

(4)RCA: 多数の杯細胞と約25%の粘液細胞が反応陽性であった(表2)。

4. 異形成

異形成上皮ではレクチンの染色様式は癌と異なり、細胞質あるいは細胞膜に WGA, UEA-1 の反応が陽性であったが、PNA, RCA 反応はまったく陰性であった(表3)。

5. 鼻副鼻腔の乳頭腫

乳頭腫の上皮層では WGA と UEA-1 で上皮の細胞膜が反応陽性であったが、PNA およ

び RCA の結合性は陰性であった(図4)。

6. 副鼻腔の腺様嚢胞腫

4例ともいずれのレクチンにもまったく反応を示さなかった。

7. 副鼻腔の扁平上皮癌

扁平上皮癌では分化によるレクチンの染色性の相異が認められた。

(1)高分化型: 高分化型では、6例中5例(83%)が図5および図6に示したように癌細胞の細胞膜、少数の細胞質の周辺部及び細胞核に WGA, PNA, RCA 陽性反応を認めたが、UEA-1 反応は陰性であった。その中でも、PNA の反応が最も高度であった。しかし、1例(17%)は WGA と UEA-1 に反応陽性であった。

(2)中分化型: この型では7例中4例(57%)は高分化扁平上皮癌とほぼ同じ染色性であったが、ほかの3例(43%)は UEA-1 にのみ反応をみとめ、他のレクチンに対しては反応性を示さなかった。

(3)低分化型: 低分化扁平上皮癌の4例中3例(75%)はいずれのレクチンにも反応陰性であったが、1例(25%)は UEA-1 のみ反応陽性であった。

考 按

組織や細胞には様々な複合糖質が存在している。細胞膜の糖蛋白は細胞相互の識別や接着、融合に働くとともに抗原認識その他の免疫学的特異性の発現に重要な役割を演じている。例えば、赤血球表面の ABO 型血液型決定物質や小腸吸収上皮細胞の微絨毛に見られる糖衣などはその代表的なものといえよう²⁾。鼻腔副鼻腔粘膜における複合糖質は膜表面の糖衣や細胞間基質のみならず、纖毛上に存在する粘液層を形成して生体防御の上でも重要な役割を果しているといわれている。ところで、生体内の複合糖質は動物の種や組織器官など部位による差異があり、またいろいろな病態によって変化することが知られている。レクチンを用いた上気道粘膜の複合糖質に関する研究のうち、正常鼻副鼻

図 1 鼻粘膜上皮下腺組織. UEA-1 反応. HRP 標識法. 粘液細胞が強く反応している. $\times 100$

図 2 上顎洞粘膜上皮. PNA 反応. HRP 標識法. 杯細胞のみ反応陽性を認める. $\times 200$

図 3 上顎洞粘膜上皮. UEA-1 反応. HRP 標識法. 杯細胞と粘膜表面の粘液がよく反応している. $\times 200$

図 4 乳頭腫. UEA-1 反応. HRP 標識法. 腫瘍外層の細胞膜に高度の反応を認める. $\times 40$

図 5 上顎洞扁平上皮癌 (高分化型). WGA 反応. HRP 標識法. 癌細胞果のみに反応を認める. $\times 40$

図 6 上顎洞扁平上皮癌 (高分化型). PNA 反応. HRP 標識法. 癌細胞の細胞膜, 少数の細胞質の周辺部および細胞核に高度の反応を示す. $\times 400$

腔，喉頭，気管粘膜及び慢性副鼻腔炎，鼻アレルギーなどについては既に報告されているが^{3) 7) 8)}，鼻副鼻腔腫瘍についての複合糖質の変化を比較検討した報告はまだまれである．今

回，われわれは4種類のレクチンを用い正常の鼻副鼻腔粘膜の複合糖質の分布を検討し，さらに乳頭腫及び悪性腫瘍化に伴って複合糖質がどのように変化するかを調べ，上皮の前癌病変よ

表2 鼻副鼻腔粘膜におけるレクチン反応

	WGA		PNA		UEA-1		RCA	
	下鼻甲介	上顎洞	下鼻甲介	上顎洞	下鼻甲介	上顎洞	下鼻甲介	上顎洞
上皮層	+	-	-	-	++	-	-	-
基底膜	-	-	-	-	++	-	-	-
固有層	-	-	-	-	-	-	+	+
血管内皮	-	-	-	-	++	++	+	+
粘液細胞	+	+	+	+	++	+	+	+
漿液細胞	-	-	-	-	+	+	-	-
杯細胞	+	+	+	+	+	+	+	+

++：高度に染色 +：軽度に染色 -：染色認めず
1：杯細胞を除いた上皮細胞

表3 鼻副鼻腔腫瘍におけるレクチン反応

		WGA	PNA	UEA-1	RCA
乳頭腫	上皮層	+	-	+	-
	固有層	-	-	-	-
異形成	上皮層	+	-	+	-
	固有層	-	-	-	-
扁平上皮癌	高分化型 (83%)	+	+	-	+
	中分化型 (43%)	+	-	+	-
	中分化型 (57%)	-	+	-	+
	低分化型 (25%)	-	-	+	-
腺様嚢胞癌		-	-	-	-

表4 扁平上皮癌のレクチン反応

WGA	PNA	UEA-1	RCA	陽性率
+	+	-	+	9/17 (52.9%)
+	-	+	-	1/17 (5.9%)
-	-	+	-	4/17 (23.5%)
-	-	-	-	3/17 (17.7%)
10/17(58.8%)	9/17(52.9%)	5/17(29.4%)	9/17(52.9%)	

り癌化の早期診断にレクチン染色が有用であるかの検討を行った。

複合糖質とは、糖質（単糖，繰り返し二糖，多糖）と蛋白質や脂質などが結合したものをいう³⁾。これらが含まれる単糖はヘキソース (galactose, mannose, glucose), ヘキソサミン (N-acetyl glucosamine, N-acetyl galactosamine), デオキシヘキソース (fucose), シアル酸, ペントースなどがあることもよく知られている⁴⁾。これらの中でわれわれの生体で重要視されているのは、フコース, ガラクトース, N-アセチルグルコサミン, N-アセチルガラクトサミン, シアル酸などである⁵⁾。そこで、本実験では WGA, PNA, UEA-1, RCA を選んで検討した (表 1)。

今回得られた正常鼻副鼻腔粘膜における複合糖質の研究結果は深水⁶⁾の上気道粘膜における糖蛋白の組織化学的研究についての報告とはほぼ一致している。正常では上顎洞粘膜は鼻粘膜に比し上皮腺細胞はわずかで杯細胞が比較的多く認められた。本研究で、UEA-1 と WGA は鼻粘膜の上皮層にびまん性反応を示し、UEA-1 は鼻粘膜の基底膜を他の部位に比較して強く染色したが、上顎洞粘膜ではこのような染色性を認めなかった。このことは鼻腔は上気道の入口部として粘膜上皮に上顎洞粘膜上皮よりフコースとシアル酸が多く含まれて防御的役割を演じていると考えられた。

一般的に気道における非定型的扁平上皮化生あるいは異形成などが前癌病変と呼ばれている。頭頸部領域では異形成上皮からなる白斑、喉頭の異形成上皮などがあげられよう⁷⁾。今まで、食道上皮の異形成と上皮内癌に関し佐藤ら⁸⁾は軽度と中等度食道上皮の異形成では UEA-1 染色陰性で、高度異形成では部分的に基底細胞が UEA-1 染色陽性を示し、上皮内癌では基底細胞の細胞質に顆粒状あるいはびまん性反応陽性を認めたと報告している。今回のわれわれの実験では、異形成上皮細胞の細胞質と細胞膜が WGA, UEA-1 反応陽性であり、

これは正常気道上皮に類似した所見であった。この結果は異形成上皮は癌細胞と異なった糖構造を持つことを示すと思われる。しかし、癌化した細胞はレクチン結合パターンが後述の如く異なっていた。

鼻腔乳頭腫についてのレクチンレセプターの分離の研究では分子量約 15000 以下の成分が Con A, WGA, RCA の各レセプターにおいて多いとの報告⁹⁾があった。乳頭腫は再発率が高く、また組織学的に一部に異型性や核分裂像が多い¹⁰⁾。時には癌化することもあるので乳頭腫は前癌病変として注意せねばならない。このような場合癌化の早期診断は極めて重要である。今回の実験では乳頭腫の上皮細胞は細胞膜のみ WGA と UEA-1 に反応強陽性を示した。これは正常上皮及び後述の悪性腫瘍とも異なった染色様式である。

悪性腫瘍の分野で、癌細胞に関する研究は化学的分析法や免疫学的方法を用いて広範に展開され、正常細胞に比較していろいろな差異が明らかにされた。その中でも糖タンパクや糖脂質などの化学成分の変化が特に注目されるようになった。レクチンによる癌細胞膜構造に関する研究についての報告は決して少なくないが、耳鼻咽喉科領域ではまれである。食道癌では上皮内癌は UEA-1 反応陰性だが、浸潤癌細胞は UEA-1 反応陽性を示した報告¹¹⁾があり、腎癌組織では clear cell と granular cell ともに WGA, RCA, Con A には陽性反応を、PNA, SBA, DBA には陽性反応を呈する報告¹²⁾もある。そのほか青木¹³⁾は子宮体癌では、UEA-1 及び PNA が強い陽性反応を呈し、とくに分化型では反応は増強し、分化度が低いと染色性は低下すると報告した。このように悪性腫瘍では、細胞構成成分中複合糖質にも変化を示すと考えられる。今回の検索の結果、鼻副鼻腔悪性腫瘍には各種レクチンに対する反応性の多様性があり、各種癌細胞膜の糖質成分に heterogeneity があることが示唆された。

扁平上皮癌では分化によって異なった染色性

を示した。すなわち、高分化型では、WGA, PNA, RCA にて癌細胞膜、部分的に細胞質、少数の細胞核が反応したのが83%に達した。中分化型では高分化型と同じ結果を示したものの(57%), UEA-1 のみ反応したものの(43%)の二つのパターンを示した。一方、低分化型では、いずれのレクチンにも反応陰性だったものの(75%)が多く、UEA-1 のみ反応陽性だったのが少数(25%)であった。腺様嚢胞癌では、いずれのレクチンにも反応陰性であったことは極めて興味深い所見である。このことは癌化する過程で広範囲な生化学的な変化を伴い、癌細胞の持つ糖鎖のうち、すくなくともN-acetyl-D-glucosamine, galactose, fucose を含めた糖構造が変化することを示唆している。そのほか、このような癌細胞のレクチン結合性の差異は細胞の分化程度を反映していると考えられる。つまり、分化度が高い癌細胞はPNA, WGA, RCA 結合性が高い傾向があり、その中でもPNA, WGA 反応がより強い。一方、分化度が低い癌細胞にはUEA-1 反応陽性になる傾向を認めた。今回の結果はPNA が分化途上の細胞と強く結合する性質を持つ考え¹⁴⁾と一致したが、UEA-1 の反応結果は異なっていた。

一方、今回用いた4種のレクチンに対して扁平上皮癌細胞の染色性は表4のような反応性が存在した。この中でWGA, PNA, RCA の3種に反応したものが最も多く52.9%であった。一方、いろいろのレクチンに対してはWGA が最も高頻度に染色され、以下はPNA と RCA, UEA-1 の順であった。これがどのような臨床的意義、例えば悪性度、転移性、放射線感受性などを持つかは今後の検討課題である。

以上より癌細胞では正常上皮細胞と比較してレクチン結合性が異なっていることから、癌化に伴う複合糖質、中でも糖質に変化が生じていることが推測される。このようにレクチンを用いて糖鎖構造の変化を組織化学的に検討するこ

とは癌化の早期診断に極めて有用な手段となりうる可能性がある。さらに、レクチンを利用した組織化学的研究は扁平上皮癌の分化度の決定やその生物学的態度、さらに臨床病態との関連性など極めて興味深い問題の解明に有用な手段になると考えられる。

まとめ

ヒト正常鼻副鼻腔粘膜と鼻副鼻腔腫瘍について複合糖質とその変化を4種類のHRP レクチン(WGA, PNA, UEA-1, RCA)により比較観察した。その結果、

1. 正常鼻粘膜では、上皮層はWGA, UEA-1 に対しびまん性に反応し、鼻副鼻腔粘膜の杯細胞と腺細胞はWGA, PNA, UEA-1, RCA に対しさまざまな反応を示した。

2. 異形成上皮細胞は細胞質と細胞膜がWGA, UEA-1 反応陽性であった。

3. 乳頭腫では上皮細胞の細胞膜のみWGA, UEA-1 反応強陽性であった。

4. 悪性腫瘍では病理組織像と分化度によって異なったレクチン染色性を示した。

- (1)低分化扁平上皮癌の75%はいずれのレクチンに対しても反応しなかった。

- (2)中分化型扁平上皮癌では、WGA, PNA, RCA に反応するものと、UEA-1 のみ反応するものが約半数ずつあった。

- (3)高分化型扁平上皮癌では83%がWGA, PNA, RCA に反応した。

- (4)扁平上皮癌において4種のレクチンが染色される頻度はWGA, PNA と RCA, UEA-1 の順であった。

- (5)腺様嚢胞癌は全例いずれのレクチンに対しても反応しなかった。

5. 以上よりレクチン染色は腫瘍マーカーとして癌化の早期診断、悪性腫瘍の分化度の判定に有用である可能性があると考えた。

文 献

- 1) 山口嘉和, 伊藤正高, 斎藤昌三, 他: ヒト健常食道粘膜におけるレクチン結合パターンの組織細胞

- 化学的検討. 解剖誌 60 : 104~108, 1985.
- 2) 高田邦昭, 平野 寛 : 細胞表面電荷の検索, 組織細胞化学1983. 日本組織細胞化学会編. 133~145頁, 学際企画, 1983.
- 3) 斎藤 等 : 複合糖質との関係. 耳鼻咽喉科, 頭頸部外科 MOOK 1 : 44~50, 1986.
- 4) 井上康男 : 糖質の化学. 生体分子の化学1. 1~195頁, 培風館, 東京, 1976.
- 5) 村松 喬 : 細胞表面の糖鎖抗原. 耳鼻 29 : 897~903, 1983.
- 6) 深水浩三 : 上気道粘膜における糖蛋白の組織化学の研究. 日耳鼻 88 : 449~454, 1985.
- 7) 下里幸雄 : 頭頸部腫瘍の病理. 臨床耳鼻咽喉科. 頭頸部外科全書8-A (広戸幾一郎, 竹田千里編). 39~61頁, 金原出版社, 東京, 1985.
- 8) Sato E, Maruta K, Yonezawa S, et al : Blood group H(o) antigen in normal, dysplastic and carcinomatous esophageal epithelium. Gann 75 : 223~229, 1984.
- 9) 松山博文 : 鼻副鼻腔粘膜の生化学的研究—糖蛋白を中心に—. 耳鼻臨床 78 : 2849~2873, 1985.
- 10) Ridolfi RL, Lieberman PH, Erlandson RA, et al : A clinicopathologic study of 30 cases. Am J Surg Pathol 1 : 43~53, 1977.
- 11) 野上博司, 伊藤正高, 平野 寛 : 食道癌. 中外医薬 38 : 706~709, 1985.
- 12) 三村晴夫, 西山文朗, 平野 寛 : 腎癌. 中外医薬 38 : 566~569, 1985.
- 13) 青木大輔, 野沢志朗, 平野 寛 : 子宮体癌. 中外医薬 39 : 436~439, 1986.
- 14) Watanabe M, Muramatsu T, Shirane H, et al : Discrete distribution of binding sites for dolichos biflorus agglutinin (DBA) and for peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. J Histochem Cytochem 29 : 779~790, 1981.

(原稿採択 : 昭和62年2月5日
別刷請求先 : 金 春順
〒514 三重県津市江戸橋2-174
三重大学医学部耳鼻咽喉科学教室)