ハムスター実験的舌癌の超微形態学的研究 第2編 癌真珠における acid phosphatase 活性について

小田島哲世* **・藤田 浄 秀**・賀 来 亨***
奥 山 富 三***・岩 井 正 行****・京 極 順 二****

Ultrastructural investigations of lingual carcinomas induced in hamsters by carcinogen II. Acid phosphatase activity in cancer pearls

Tetsuyo ODAJIMA* **・Kiyohide HUIITA**・Tohru KAKU***
Tomizoh OKUYAMA***・Masayuki IWAR****・Junji KYOGOKU****

緒 言

組織化学的に acid phosphatase (以下 ACPase と略す) 活性強陽性に染まる部分が角化重層扁平上皮ではその上層を中心に数層にわたって存在し¹⁻³⁾, またこの ACPase 活性陽性部分を電顕細胞化学的に観察すると, ACPase 活性は keratinosome (以下 KS と略す) に局在することも知られており⁴⁾, KS は重層扁平上皮の機能や角化機構に重要な役割を果たしているものと考えられている。一方, 高分化型扁平上皮癌の癌真珠の部分も ACPase 活性強陽性となるが³⁾, 扁平上皮癌における細胞レベルでの ACPase 活性の局在については深く追求されていない。

今回, ハムスター実験的舌癌における癌真珠の部分

中心に ACPase 活性の電顕的局在を詳細に観察し, 扁平上皮癌の角化形態と ACPase 活性との関連についても考察してみたので報告する。

材 料 と 方 法

既報のごとく^{5,6)}, 実験材料に生後約 2 か月の雄ゴールデンハムスターの舌粘膜に発癌剤を塗布することによって形成された舌癌と正常舌粘膜とを用いた。実験方法としては, 光顕用組織には 4% paraformaldehyde 溶液で 8 時間固定, 6 μ の氷結切片とし, 電顕用組織には緩衝 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde 混合溶液で 2 時間固定後, ビブラトームで 40 μ 切片とした。次にこれらの光顕ならびに電顕用切片をそれぞれ三分割し, 一部の光顕用切片には Novikoff 法⁷⁾による ACPase

* 札幌医科大学病理学教室(主任: 小野江為則教授)

** 横浜国立大学医学部口腔外科学教室(主任: 大谷隆俊教授)

*** 東日本学園大学歯学部口腔病理学教室(主任: 奥山富三教授)

**** 札幌医科大学口腔外科学教室(主任: 小浜源郁教授)

* Department of Pathology, Sapporo Medical College (Chief: Prof. Tamenori Onoe)

** Department of Oral Surgery, School of Medicine, Yokohama City University (Chief: Prof. Takatoshi Ohtani)

*** Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Higashi Nippon Gakuin University (Chief: Prof. Tomizoh Okuyama)

**** Department of Oral Surgery, Sapporo Medical College(Chief: Prof. Gen-iku Kohama)

受付日: 昭和54年10月24日

写真 1 正常舌粘膜上皮

顆粒層上部に ACPase 活性が強い。(hematoxylin 核染色, $\times 320$)

写真 2 扁平上皮癌

癌真珠に ACPase 活性が強い. (hematoxylin 核染色, $\times 150$)

写真 3 基底細胞

ACPase 活性は lysosome (矢印) に局在. N : 核, D : desmosome, M : mitochondria. (非電子染色, $\times 15,530$)

写真 4 ACPase 活性陽性物質を含む KS. ($\times 80,000$)写真 5 KS は顆粒細胞の遠位細胞膜付近に分布する. KG: keratohyalin granule. ($\times 13,270$)

写真 6 顆粒層上部の拡大した細胞間隙にみられる KS 由来構造物. ($\times 32,000$)

写真 7 顆粒層細胞間隙にみられる ACPase 活性陽性の物質. D: desmosome. ($\times 33,250$)

写真 8 KS. ($\times 16,000$)

写真 9 扁平上皮癌の癌真珠 (CP)

Tf の分布, 配列の異常, KS の散在性分布がみられる. N: 核. ($\times 6,810$)

反応を施し, ammonium sulfide で発色させ, hematoxylin で核染色, あるいは無染色とし, もう一部の切片には ACPase に対する反応を行わず, hematoxylin と eosin 染色を施した. 電顕用切片には Novikoff 法⁷⁾による ACPase 反応を行ったのち, ACPase 反応を行わなかった切片とともに 1% osmic acid 酸で後固定, 脱水, Epon 包埋し, 超薄切片に uranyl acetate と lead citrate の二重染色を施すか, あるいは無染色とした. また残る一部の切片には ACPase の反応液から基質を除

いた溶液に浸漬し, 標本を作製した.

結 果

1. 光学顕微鏡的所見

正常舌粘膜上皮における ACPase 活性は, 上皮下層では基底細胞の細胞質内に黒褐色の小顆粒状の沈着物としてまれに認められるのみで, 上層では顆粒層の最上部の細胞を中心に数層にわたってびまん性に存在する (写真

写真 10 扁平上皮癌，癌胞巣辺縁部の細胞

ACPase 活性は lysosome に局在，Mi: mitochondria. ($\times 14,620$)

写真 11 扁平上皮癌，癌真珠 (CP) と周辺の細胞

ACPase 活性は lysosome (矢印) と一部の細胞に散在性に局在するが，細胞間隙には活性はほとんどみられない. ($\times 7,700$)

写真 12 扁平上皮癌，癌真珠周辺の細胞

ACPase 活性は KS に局在するのみ，細胞間隙にはみられない D: desmosome. (非電子染色， $\times 19,310$)

1). 一方，高分化型扁平上皮癌では癌真珠や比較的角化した部分に強い ACPase 活性があり，癌胞巣の辺縁部の細胞では細胞質に ACPase 活性陽性の小顆粒がしばしば認められた (写真 2).

2. 電子顕微鏡の所見

1) 正常舌粘膜上皮：光顕的に上皮層に認められた ACPase 活性陽性の顆粒は lysosome で (写真 3)，上皮層における ACPase 活性は層板構造を有する KS に局在していた (写真 4). KS は有棘層上部の細胞にはじめて見出しされ，顆粒層の細胞では細胞膜に近接して存在し (写真 5)，顆粒層上部になると細胞間隙に見い出されるようになる (写真 6). ACPase はこの KS の動きに一致してその局在が推移し，細胞間隙では細胞膜外葉に電子密度のある粒子として認められた (写真 7).

2) 扁平上皮癌：高分化型扁平上皮癌の癌胞巣を構成する細胞は，基本的に正常角化重層扁平上皮の細胞の超

微形態を模倣しているが，個々の細胞によってその形態は異なり，多彩な像を呈する. 癌胞巣辺縁部では細胞間隙の拡大，細胞表面からの多数の微絨毛の発達，desmosome の数の減少を伴い，比較的大形の核をもち，細胞質に豊富な細胞小器官をもつ細胞が多かった. しばしばほとんど tonofilament をもたない細胞もみられ，逆に大量の tonofilament をもつ細胞や単一角化細胞も散見された. KS は癌胞巣辺縁部に近い細胞にもすでに認められ，癌真珠周辺の細胞ではその数を増し，また tonofilament の発達とは無関係に存在していた (写真 8). 癌真珠は，tonofilament の凝集塊で占められた高電子密度，無構造の細胞を中心に，適度に凝集した tonofilament や，ある程度発達した細胞小器官をもつ扁平な細胞が同心円状に配列したものである (写真 9). KS は正常上皮でみられるように細胞膜の近くに分布するよりは，むしろ細胞質全体に散在し (写真 8, 9, 11, 12)，細胞

間隙にみられることはほとんどなかった(写真9, 11, 12). またKSは内部に明らかな層板構造をとることは少なく、ほとんどのものは無構造に近い構造をしており(写真8), しかも周囲の境界膜も明瞭でないものが多かった。癌真珠を構成する細胞, あるいは周囲の細胞すべてがKSをもっているとは限らず、ほとんどKSをもたない細胞もしばしばみられた(写真9, 11)。

ACPaseはこのような癌細胞のlysosomeやKSに局在していたが(写真10, 12), 癌真珠を構成する細胞, あるいは周囲の細胞の細胞間隙や細胞膜外葉にACPase陽性物質が沈着することはほとんどなかった(写真11, 12)。またこの層ではACPase活性はKS以外にも細胞質に遊離して存在することがあったが(写真11), 反応液から基質を除いた反応ではこのようなACPase活性陽性の沈着物はみられなかった。

考 察

今回の電顕細胞化学的観察からACPaseは正常上皮と同様、扁平上皮癌においてもlysosomeとKSに局在することが見い出された。

一般に正常上皮におけるKSの働きは、(1)細胞間隙に放出されたKSの内容物、特にACPaseなどの加水分解酵素が細胞間結合を解き、角質細胞の剝離を促進させているという考え⁸⁾、(2)同様にKSに含まれる糖類、脂質が細胞間隙に放出されたあとこれらの物質が細胞膜外葉に沈着することにより、角質細胞間の接着剤として働く⁹⁾と同時に、(3)細胞膜肥厚にあずかり¹⁰⁾、外界からの物理化学的刺激や化学物質の浸透に対するbarrierを形成するという考え¹¹⁾、など種々の考えがある。

ここで注意しなければならないのは、扁平上皮癌にみられるKSも正常上皮に比べると同様の機能をもっているのかどうかである。癌細胞におけるKSについて詳細に観察した報告はないが、癌細胞は不完全ながらもkeratinocyteとしての機能をもっており、高分化型の扁平上皮癌は正常の角化重層扁平上皮の層構造や角化形態を模倣している。高分化型の扁平上皮癌では正常上皮と同様、多数のKSがみられるが、その分布、発達の程度は個々の細胞によって、おおいに異なり、KSは細胞質に散在性に分布し、しかも細胞間隙や細胞膜外葉にはほとんどACPase活性陽性物質の沈着が認められない点で、正常上皮の場合と異なっている。

一般に細胞のturnoverが亢進するとKSは増加するといわれるが¹²⁾、癌細胞のturnover timeは正常母細胞よりも低下することがあり¹³⁾、必ずしも癌細胞のturnoverが亢進しているとは限らない。したがってKSの細胞質内遺残は、細胞の癌真珠への推移が早すぎるために、KSが細胞間隙へ移動できないと考えるよりは、

癌では本質的にKSの細胞間隙への放出が障害され、そのためKSが細胞質に留まるものと考えた方がよい。それゆえ細胞質に遺残したKSは本来の機能を果たすことができないものと思われ、癌真珠を構成する細胞は正常上皮の顆粒層や角質層の細胞と同様の機能をもっているとは考えられない。

ACPase活性はKS以外にも細胞質に遊離して存在することがあるが、反応液から基質を除いた反応ではこのような高電子密度の物質の沈着はみられないので、細胞質におけるACPaseの局在は特異的と考えてよい。この細胞質に遊離に存在するACPase活性陽性の物質は、KSから放出されたもので、KSの境界膜は破壊されやすいものと考えられる。このように細胞質に放出されたKSの内容物は、癌真珠の細胞の変性、壊死を促進させる一要因となっているものと思われる。

結 語

ハムスター舌粘膜上皮の上層部と実験的舌癌の癌真珠の部分を中心に、ACPase活性の局在を電顕細胞化学的に検索した。

正常上皮の上層の細胞には多数のKSがみられ、細胞が角質層に移行するにつれ、KSは細胞膜の近くに移動し、顆粒層最上層では細胞間隙に存在していた。ACPase活性はこのようなKSに局在し、しかもKSの動きに一致した局在を示した。

癌真珠やその周辺の細胞にもACPase活性陽性物質を含むKSが多数みられたが、KSは細胞質に散在するのみで、細胞間隙にはみられなかった。このような扁平上皮癌におけるKSの細胞質内遺残は、癌細胞の分化の際の本質的な性質と考えられた。

引 用 文 献

- 1) Moretti, G. and Mescon, H.: A chemical-histochemical evaluation of acid phosphatase activity in human skin. *J Histochem Cytochem* 4: 247 1956.
- 2) Ten Cate, A.R.: The distribution of acid phosphatase, non-specific esterase and lipid in oral epithelia in man and the macaque monkey. *Arch Oral Biol* 8: 747 1963.
- 3) Mori, M., et al.: Histochemical observations on enzymatic processes of experimental carcinogenesis in hamster cheek pouch. *Cancer Res* 22: 1323 1962.
- 4) Wolff, K. and Holubar, K.: Odland-Körper (Membrane-coating granules, Keratinsomen) als epidermale Lysosomen. Ein elektronenmikroskopisch-cytochemischer Beitrag zum Verhornungsprozeß der Haut. *Arch Klin Exp Derm*

- 231: 1 1967.
- 5) 藤田浄秀, 他: 舌癌の実験的形成に関する研究, 第1編 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene の塗布による舌癌の実験的形成. 口科誌 21: 999 1972.
 - 6) 小田島哲世, 他: 舌癌形成実験における発癌剤の高頻回塗布による発癌効果について. 日口外誌 25: 65 1979.
 - 7) Novikoff, A.B.: Lysosomes in physiology and pathology of cells: Contributions of staining methods. In: Lysosomes, ed by DeRueck A.S. and Cameron, M.P., London Ciba Found Sym 1963, p. 36.
 - 8) Weinstock, M. and Wilgram, G.F.: Fine-structural observations on the formation and enzymatic activity of keratinosomes in mouse tongue filiform papillae. J Ultrast Res 30: 262 1970.
 - 9) Hashimoto, K.: Cementsome, a new interpretation of the membrane-coating granule. Arch Derm Forsch 240: 349 1971.
 - 10) Matoltsy, A. and Parakkal, P.E.: Membrane-coating granules of keratinizing epithelia. J Cell Biol 24: 297 1965.
 - 11) Farbman, A.I.: Electron microscope study of a small cytoplasmic structure in a rat oral epithelium. J Cell Biol 21: 491 1964.
 - 12) Wilgram, G.F.: Das Keratinosomen: ein Faktor im Verhornungsprozeß der Haut. Hautarzt 16: 377 1965.
 - 13) 久保雄治: *In vitro* ^3H -thymidine autoradiography による食道癌の細胞増殖の解析. 発癌による実験的研究と制癌剤の影響を中心として. 京府医大誌 81: 505 1972.