実験上皮癌におけるビタミン A 酸誘導体 (Ro 10-9359)

投与の影響に関する研究

——病理組織学的, レクチン結合性, ケラチン組織化学的ならび
にマイクロオートラジオグラフィーによる観察——

玄 景華

Effects on administration of retinoic acid analogue (Ro 10-9359, Etretinate) in chemically induced epithelial tumors

——Histopathologic, lectin binding, keratin histochemical
and microautoradiographic observations——

Kyung-Hwa HYUN

Abstract: Effects on administration of anti-tumor retinoid (Ro 10-9359, Etretinate) were studied in papilloma and squamous cell carcinoma experimentally induced from mice dorsal skin and hamster cheek pouch. Histochemical study of lectin binding and immunohistochemically detectable study of keratin, and microautoradiographic observation (^3H -Etretinate, ^3H -Vitamin A alcohol) were carried out.

Intercellular bridges in treated tumor epithelia were decreased and intercellular space were more spread. Tumor epithelial cells were separated from each other and they showed vacuolization at the area corresponding to granular and spinous cell layers, however, no PAS positive materials were contained there. Lectin binding and keratin staining were decreased in tumor epithelial cells which are affected by Etretinate. These were slightly positive or negative to lectin and keratin reactions in intercellular space and vacuolated tumor cells.

Microautoradiographic observation showed fine silver grains at the intercellular space and around the cell membrane in tumors, however, no deposits were in the cytoplasm of the tumor epithelial cells.

It was concluded that vitamin A derivative Etretinate may affect the intercellular spaces and cellular membrane of tumor epithelia, possibly cause changes of the permeabilities, sugar residues of cell membranes and cytoskeletal structures, and finally break down to cytoplasm of tumor cells.

Key words: Retinoid, Lectin binding, Keratin

緒 言

近年, 上皮性悪性腫瘍および皮膚疾患に対する化学療

法の研究は多方面にわたっており臨床面においても治療成績の向上には著しいものがある。これらの中でもビタミン A と癌との関係が注目をあびており, ビタミン A 誘導体 (レチノイド) を用いて癌を予防しようという概念が生れ, さらに積極的に治療面で臨床応用されたのは比較的最近のことである¹⁻⁴⁾。近年, 過角化病変ならびに上皮性悪性腫瘍に対する治療効果が高く, ビタミン A 過剰症による副作用の少ない ビタミン A 酸誘導体 (Etretinate) が開発された^{5,6)}。これを用いた動物の実験上皮

朝日大学歯学部口腔外科第 1 講座

(主任: 森 昌彦教授)

1st Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Asahi University (Chief: Prof. Masahiko Mori)

受付日: 昭和60年3月20日

図 1 Ro 10-9359

癌に著明な腫瘍縮小効果および増殖抑制効果が認められ⁷⁻¹⁰⁾、ヒトの角化病変や上皮性悪性腫瘍の治療に多くの臨床応用がなされている¹¹⁻¹⁴⁾。しかし上皮性腫瘍に対するビタミンA酸誘導体の作用機序は不明な点が多く、上皮細胞間の接合や細胞膜への影響が主な作用機序と考えられている。

著者はヒトの角化型皮膚腫瘍に類似しているマウス背部皮膚腫瘍とヒトの口腔粘膜癌に類似しているハムスター頬囊粘膜癌を実験材料に用いて Etretinate 投与の影響を検討した。形態学的には細胞接合部の変化を検索し、腫瘍細胞の細胞膜糖鎖構造の変化をレクチン染色で観察した。また、ケラチンの免疫組織化学的方法により Etretinate の角化への影響を検討した。さらに放射性同位元素を利用した主要臓器への取り込みとマイクロオートラジオグラフィーの観察により、Etretinate の作用部位および作用機序についても検討した。

実験材料と実験方法

I. 実験材料

1. 動物：生後4週齢の雄 ddY マウス (体重 18～20 g) および同雄シリアンゴールデンハムスター (体重 100～120 g) を使用した。マウスはマウスケージ、ハムスターはラット用ブラケットケージにそれぞれ各5匹ずつ入れ、室温 22±2°C、湿度 60±5%、照明 12 時間の環境下で、オリエンタル酵母飼料と水にて4週間飼育した後、発癌実験を開始した。発癌実験は両動物ともに1回の実験において100匹を使用し、2回の実験を行った。そのなかで実験材料として用いたものは、それぞれ85匹である。

2. 発癌：発癌剤は 0.5% 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA, Sigma, USA) のアセトン溶液を用いた。マウスは背部皮膚中央を 20×20 mm 剃毛し、無麻酔下で毛筆にて週3回発癌剤を塗布した。発癌開始後12～16週で病理組織学的に乳頭腫および扁平上皮癌を形成する。これらの中で直径 5 mm 以上の乳頭腫および扁平上皮癌を有するマウスに Etretinate を投与した。ハムスターは左側頬囊粘膜に上記の発癌剤を無麻酔下で毛筆にて週2回塗布した。発癌開始後約4週目より潰瘍形成、8～10週目より乳頭腫形成、さらに12～16週目より出血を伴う著しい外向性増殖を示し、病理組織学的に扁平上皮癌を形成した。これらのなかで12週以後の直径 5

表 1 レクチンおよび糖特異性と濃度

Lectin	Origin	Sugar specificity	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
Con A	Concanavalia ensiformis	D-Glc, D-Man	100
SBA	Glycine max	D-Gal, GalNAc	20
DBA	Dolichos biflorus	GalNAc	20
PNA	Arachis hypogaea	D-Gal	20
UEA-I	Ulex europeus-I	L-Fuc	50
UEA-II	Ulex europeus-II	GlcNAc	50
RCA-I	Ricinus communis-I	D-Gal	20
WGA	Triticum vulgaris	GlcNAc, NANA	50

GalNAc: N-acetyl-galactosamine, GlcNAc: N-acetyl-glucosamine, Gal: galactose, Glc: glucose, Man: mannose, Fuc: fucose, NANA: N-acetyl-neuraminic acid

mm 以上の乳頭腫および扁平上皮癌を有するハムスターにマウスと同様に Etretinate の投与を行った。

3. ビタミンA酸誘導体の投与：ビタミンA酸誘導体は Etretinate (Ro 10-9359, 日本ロシュ K.K.) を使用した (図1)。化学的には ethyl all-trans-9-(4-methoxy-2,3,6-trimethyl-phenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonate-2,4,6,8-tetraenoate で、結晶性粉末で分子量 354.49 ($\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_3$)、融点 104～107°C、光に対しては不安定である。

II. 実験方法

1. Etretinate 投与方法：煮沸滅菌したピーナッツオイルの懸濁液としてマウス、ハムスターともに腹腔内に投与した。マウスは1回投与量 30 mg/kg (0.1 ml, ピーナッツオイル) で週3回投与、ハムスターは1回投与量 50 mg/kg (0.2 ml, ピーナッツオイル) で週3回投与した。最終投与日より1, 3, 5, 7, 10, 15, 20日経過後に動物の腫瘍部分を注意深く観察し屠殺した。屠殺時期のマウス、ハムスターはともに各群10匹ずつとした。対照群として Etretinate を投与していない発癌動物を用いた。

2. 病理組織学的観察：周囲組織を含めて腫瘍組織を摘出後、ただちに10%ホルマリン (室温, 12時間) およびカルノア液 (4°C, 6時間) で固定した後、4 μm パラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色, PAS 染色, トルイジンブルー (TB, pH 7.0) 染色を行った。さらに微細構造の観察のため、通常のエンド固定後エポン包埋し、Cambridge 社製ウルトラミクロームで 1 μm 切片を作製し TB 染色 (pH 7.0) を行った。これらの病理組織学的所見と以下に述べるレクチンによる糖鎖の組織化学的所見、ケラチンの免疫組織化学的所見およびマイクロオートラジオグラフィーの所見等

と比較検討した。

3. レクチンを用いた糖鎖の組織化学的証明方法：カルノア固定後 4 μ m 連続切片を作製しレクチン染色を行った。レクチンは horseradish peroxidase (HRP) で標識されていない Con A (Sigma, USA) と HRP で標識された SBA, DBA, PNA, UEA-I, UEA-II, RCA-I, WGA (E.Y. Lab. USA) を使用した (表1)。

染色方法：脱パラ後、組織切片内の内因性ペルオキシダーゼを除去するために 0.3% H_2O_2 /メタノール溶液中に 20 分間浸漬し、水洗後、phosphate buffered-saline (PBS) に 10 分間浸漬し以下のごとく各レクチン染色を行った。すべてのレクチン反応は室温にて行った。

1) Con A-HRP 法¹⁸⁾

(1) Con A-HRP 法 (Con A-HRP)：内因性ペルオキシダーゼ除去後、PBS で洗浄し 0.1% Con A 溶液に 30 分間浸漬した後、PBS (15分間) で洗浄し、0.0005% HRP 溶液 (Sigma, USA) に 30 分間浸漬した。PBS で洗浄したのち 0.03% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride 溶液 (DAB, 同仁化学研) で発色させた (10分間)。

(2) Periodic acid oxidation Con A 法 (PA/Con A-HRP 法)：1% 過ヨウ素酸ナトリウム溶液に 30 分間浸漬し、その後 Con A-HRP 法を行った。

2) HRP 標識レクチン法

SBA, DBA, PNA, UEA-I, UEA-II, RCA-I, WGA レクチン溶液に 40 分間浸漬後、PBS で洗浄し、DAB 溶液にて発色させた (方法の詳細は文献16を参照)。

4. ケラチンの免疫組織化学的証明方法：カルノア固定後、4 μ m 切片によりケラチンを peroxidase antiperoxidase complexes (PAP) 法にて証明した。レクチン染色と同様に内因性ペルオキシダーゼを除去した後、0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.6) で洗浄し、非特異的反応を防止するため正常豚血清 (20 倍希釈, Dakopatts, Santa Barbara, CA, USA) で 30 分間反応させ、その後抗ヒトケラチン家兎抗血清 (50 倍希釈, Dakopatts, Santa Barbara, CA, USA) に 60 分間反応させた。その後トリス緩衝液で洗浄し、抗家兎 IgG 豚抗血清 (20 倍希釈, Dakopatts, A/S Copenhagen, Denmark) に 30 分間反応させ緩衝液で洗浄した。さらに PAP 溶液 (100 倍希釈, Dakopatts, A/S Copenhagen, Denmark) に 30 分間反応させ、トリス緩衝液で洗浄後 DAB 溶液にて発色させた。対照試験として抗ヒトケラチン家兎抗血清の代りに正常家兎抗血清を用いて反応させた。染色結果は陰性で抗原抗体反応の特異性を確認した。この証明法に用いた抗体はすべてトリス緩衝液で希釈し室温で反応を行った。

5. ビタミンAの取り込みおよびマイクロオートラジオグラフィー：ビタミンAの取り込みおよび作用部位を検索するために、液体シンチレーション測定法とマイクロオートラジオグラフィーを行った^{17,18)}。使用した核種、動物および投与方法は以下のごとくである (図2)。

図 2

使用した動物は対照群のマウス発癌動物から選択した。投与量は ³H-ビタミンA アルコールが 1 μ Ci/g および ³H-Etretinate が 10 μ Ci/g で、それぞれ腹腔内投与し、投与後 30 分、4 時間後に屠殺した。屠殺後、腫瘍部分を摘出したにちドライアイスアセトン中で凍結し、O.C.T. compound (Ames) で包埋した。その後 12 μ m 凍結切片を製作し、暗室にてサクラ NR-M 2 (1.5 倍希釈)の乳剤を塗布したスライドガラスの上に貼付した。その後、暗箱内で 4~10 週間露出 (4°C) させた。現像は 5 分間 (サクラコニドール X, 室温) 行い、その後定着、水洗し 10% ホルマリン固定 (20 分間, 室温) 後、TB (pH 7.0) で後染色を行った。対照試験として放射性同位元素 (RI) を含まない腫瘍部分を用いてマイクロオートラジオグラフィーを行った。

組織内のビタミンAの取り込みは屠殺後、直ちに主要臓器 (腫瘍、皮膚、腎臓、肝臓) を摘出し、組織重量を測定後、自動サンプル燃焼装置 (Automatic Samples Oxidizer, ALOKA ASC-111 型) を用いて、ラベルした ³H を捕集し液体シンチレーションカウンター (ALOKA LSC-653 型) で測定した。

結 果

1. 対照動物および Etretinate 投与動物の肉眼的所見 a) マウス

対照群では淡赤色、弾性硬の境界明瞭な小さな乳頭腫がみられ、腫瘍が増大すると一部に潰瘍形成と出血を認める。Etretinate 投与群では最終投与日前後より腫瘍の縮小傾向を示し、直径 2~5 mm の乳頭腫では一塊として脱落する。直径 5 mm 以上の乳頭腫では経時的に腫瘍表面より剝離、脱落し、最終投与後 7~10 日目において多くの潰瘍形成面が融合し、大きな黒い痂皮状を呈するようになる。一部の腫瘍は縮小傾向を示さず増大するものもみられ、その効果に個体差が認められる。体重の減少はすべてのマウスに認められるが、明確な過ビタミン

A 症候群による副作用はみられない。

b) ハムスター

対照群では大部分暗赤色の乳頭腫様増殖を示し、部分的に潰瘍、出血を認める。Etretnate 投与群ではマウス実験腫瘍の如く腫瘍が一塊として脱落するものではなく、全体に腫瘍表面より経時的に壊死、融解を繰り返しながら縮小していく。腫瘍は次第に灰白色を呈し一部に出血傾向を認めるが、マウスと比較して個体差が少なく全体に腫瘍の縮小傾向が強い。ハムスターにおいてもマウスと同様に体重減少を認めるが、過ビタミンA 症候群、腫瘍転移および全身衰弱による死亡はほとんど認められない。

2. 病理組織学的所見

a) マウス

①正常表皮および発癌過程の腫瘍組織の所見：正常マウス背部皮膚は1～3層の表皮細胞からなり乳頭層の発育は悪い。真皮結合組織には毛根、皮脂腺および毛細血管等が存在する。DMBA 塗布12週以後になると外向性増殖を示し、それらの大部分は乳頭腫で著明な過角化症がみられ、一部には錯過角化症を認める。さらに顆粒細胞層と棘細胞層の肥厚を示すものが多い。基底細胞層では強い異型性はみられず、基底膜の破壊は認められない。PAS 染色では棘細胞にびまん性に陽性を示し、基底膜と間質結合組織にも反応がみられる。16週以後において腫瘍は浸潤増殖を示し、高度および中等度に角化した扁平上皮癌を形成する。腫瘍細胞は基底膜を破り結合組織内に浸潤し、島状および索状に癌巣(癌真珠を含む)を形成し、浸潤した腫瘍細胞の核に比較的強い異型性が認められる。表層では一部の角化層や壊死物質の剝離、脱落がみられる。PAS 染色で腫瘍細胞に弱い反応を認め、基底細胞層に相当する腫瘍細胞ではその染色性は不明瞭となる。TB 染色では深部に浸潤した腫瘍細胞に強い染色性を示す。乳頭腫および扁平上皮癌ともに間質は線維性肉芽組織の形成が著明で、これらの中に炎症性細胞浸潤と毛細血管の拡張が認められる。同一個体上で上記の乳頭腫と扁平上皮癌の混在するものがみられ、これらは16週以後のものである。

② Etretnate 投与後の所見(写真2A, C, D)：腫瘍周囲の正常表皮細胞は対照群と比較して著変を認めない。乳頭腫において角化層は大部分が錯過角化(不全角化)を示し、それらの一部は壊死、融解による崩壊がみられる。対照群の乳頭腫と比較して過角化層の剝離、脱落の傾向が強い。顆粒細胞層は減少し、過角化層直下もしくは上部棘細胞層直上部分の腫瘍細胞では大小不同の空胞形成がみられ、これらの部位の細胞はPAS 陰性である。これらの空胞内には軽度の炎症性細胞浸潤や破壊された細胞質の一部が存在している。下部棘細胞層における腫瘍細胞の細胞間隙は拡大しており、上部棘細胞層の細胞間隙は対照群と比較してさらに拡大し細胞間橋が

減少もしくは伸展しているが、腫瘍細胞が完全に遊離するまでに至っていない。基底細胞層に大きな変化は認められない。腫瘍間質には中等度の炎症性細胞浸潤がみられる。浸潤性増殖を示す扁平上皮癌では、最終投与日前後から下部棘細胞層に相当する部位の腫瘍細胞が好塩基性で細胞質や核に強い変性を受けずに、細胞間橋の減少、伸展および破壊により完全に遊離したものが認められる。投与後15～20日目では核濃縮をきたした好酸性腫瘍細胞が剝離、脱落するのが認められる。これは Etretnate が有効と判断された症例においてみられる所見である。著明な腫瘍増殖を示した部位の腫瘍細胞では細胞間隙が拡大し、一部の腫瘍細胞が punch out 状に空胞化する。基底細胞に相当する腫瘍細胞では種々の程度の異型性を示すが、空胞化および遊離化は認められない。腫瘍間質に浸潤した腫瘍細胞のなかで、著明に角化し他の腫瘍細胞に比較して大きく1個もしくは数個～10数個の集団をなした好酸性腫瘍細胞がみられ、一部は変性、崩壊しているものも認められる。腫瘍間質には著明な炎症性細胞浸潤がみられ表層にまで及び、わずかに残存腫瘍細胞を認めるだけのものもみられる。

b) ハムスター

①正常粘膜上皮および発癌過程の腫瘍組織の所見(写真1A, B)：正常ハムスター頬嚢粘膜は3～5層の上皮細胞からなり、乳頭はほとんどなく上皮層直下には薄い結合組織を介して筋層が存在している。

DMBA 塗布6～8週以後易出血性の潰瘍形成を認め、結合組織中に索状、蕾状に上皮細胞の増殖がみられる。12週以後では上皮細胞の増殖とともに線維性肉芽組織が増殖をはじめ、外向性増殖を示す乳頭腫を形成する。PAS 染色では基底膜、間質結合組織に陽性反応を示す。16週以後では大部分が高分化および中等度に分化した扁平上皮癌に進展していく。深部結合組織中に浸潤した腫瘍細胞は索状増殖を示すものと、さらによく角化し癌真珠形成が著明なものがある。腫瘍細胞は種々の程度の異型性および異角化を示す。マウス実験腫瘍と比較して角化度やケラトヒアリン顆粒形成は軽度である。表層部はマウスのそれと比較すると壊死、融解を示すものが多く過角化を示す部位では剝離、脱落がみられる。腫瘍間質では炎症性細胞浸潤が認められ、毛細血管の拡張や新生が著明である。PAS 染色では基底膜構造が不明瞭となる。TB 染色では深部に浸潤増殖した腫瘍細胞に強い染色性を示す。

② Etretnate 投与後の所見(写真1C, D, E, F)：腫瘍周囲の正常粘膜上皮は対照群と比較して著変を認めない。乳頭腫および扁平上皮癌において投与後10日目までの初期では、腫瘍表層部の壊死、融解が対照群と比較して広範囲に及び、一部のものは腫瘍間質までその影響が及んでいる。上皮肥厚を示す部位では腫瘍細胞の細胞間隙が拡大し細胞間橋が伸展もしくは破壊されており、

表 2 マウス正常表皮および発癌過程におけるレクチン、ケラチン染色性

	正 常 表 皮		乳 頭 腫			扁平上皮癌	
	表皮細胞	真皮結合組織	基底細胞	棘細胞	過角化細胞	浸潤腫瘍細胞	増殖腫瘍細胞
Con A	2	2	±	1～2	0	±～1	±～1
PA/Con A	0	±	1	1～2	0	±	1
SBA	3	0	±～1	2～3	0	1～2	2
DBA	2	0	±	2	0	1～2	1～2
PNA	3	0	±	2～3	±～1	1～2	1～2
UEA-I	3	0	±	2～3	0	1	±～1
UEA-II	1～2	1	1	1	0	1	±～1
RCA-I	2	2	1～2	1～2	1	1	1～2
WGA	2	1～2	1～2	1～2	1	1～2	±～1
Keratin	3	0	±～1	2～3	±	2～3	1～3

レクチン、ケラチン染色性の評価：0；陰性反応，±；痕跡程度の反応，1；弱陽性反応，2；中等度陽性反応3；強陽性反応

腫瘍表層部では比較的細胞障害を受けていない腫瘍細胞と核濃縮をきたした好酸性腫瘍細胞が遊離，脱落しているのが認められる。特に角化の著明な部位では上記の壊死，融解を示す所見と，さらに一部に核濃縮を伴う腫瘍細胞の遊離，脱落が特徴である。Etretinate 投与群マウスと同様に上部棘細胞層に相当する部位に空胞化した腫瘍細胞がみられ大部分は核，細胞質が破壊もしくは消失し，下部棘細胞層に相当する腫瘍細胞の細胞間隙が拡大し，一部に細胞間物質が認められる。この所見は乳頭腫によくみられ，マウスに比較してこれらの空胞の出現頻度が高い。基底細胞層に相当する腫瘍細胞には著変を認めない。深部増殖を示す腫瘍細胞には核濃縮や空胞変性を認め，変性した腫瘍の細胞膜や周囲の物質はエオジンに強染する。これは Etretinate 投与マウス皮膚腫瘍では認められないのでハムスター特有の所見といえる。

3. レクチンによる糖鎖の組織化学的所見

a) マウス

①正常表皮および発癌過程の腫瘍組織の所見：正常表皮細胞では細胞質に Con A (+2)，SBA (+3)，DBA (+2)，PNA (+3)，UEA-I (+3) が陽性反応を示す。真皮結合組織では Con A (+2)，UEA-II (+1)，RCA-I (+2)，WGA (+1～2) が反応を示し，特に毛根上皮では表皮細胞と同様に強い反応がみられる。

乳頭腫では表層の過角化部のレクチン染色 (PNA，RCA-I，WGA) は陰性かもしくは弱陽性を示す。腫瘍細胞では上部棘細胞層で Con A (+1～2)，SBA (+3)，DBA (+2)，PNA (+3)，UEA-I (+2～3) が陽性で，基底細胞層では陰性か弱陽性である。また，腫瘍上皮全層にわたって UEA-II (+1)，RCA-I (+1～2)，WGA (+1～2) が反応を示す。顆粒細胞層の顕著な腫瘍上皮ではその部位に SBA，PNA，UEA-I レクチンの強い反

応を認め，PA/Con A 染色では棘細胞層に顆粒状の陽性反応 (+2) がみられ，基底膜にも一部反応を認める。腫瘍間質では線維性肉芽組織に Con A (+2)，RCA-I (+2～3)，WGA (+1) の反応を認める。正常表皮および乳頭腫において SBA，DBA，PNA，UEA-I レクチンは層の分布を示す。扁平上皮癌において浸潤した腫瘍細胞に SBA (+1～2)，DBA (+1)，PNA (+1～2)，UEA-I (+1)，WGA (+1～2) が陽性を示し，特に癌真珠を形成する角化部周囲の腫瘍細胞に強いレクチン染色 (SBA，PNA，UEA-I) を認め，角化部は Con A，RCA-I，WGA レクチンが弱い反応を示す。腫瘍細胞が一部に異型性を示し深部に増殖している部位では，乳頭腫のレクチン染色より減弱し，かつ不規則な染色性を示すようになる。剝離した角化細胞や壊死物質に SBA，PNA，WGA レクチンが強い反応を示す。腫瘍間質の反応は乳頭腫と類似している。(表2)

② Etretinate 投与後の所見 (写真2F)：腫瘍周囲の正常表皮の各レクチン染色には著変は認められない。乳頭腫においては，上部棘細胞層の空胞化した腫瘍細胞に Con A (±)，PA/Con A (+1)，PNA (±)，RCA-I (±) の反応がみられ，下部棘細胞層の腫瘍細胞のレクチン染色は減弱する傾向にある。錯過角化部ではレクチンの染色性はほとんどみられず，壊死，崩壊に陥った一部の角化部に Con A (+1～2)，SBA (+3)，PNA (+3)，RCA-I (+1～2)，WGA (+2) の反応が認められる。表皮肥厚部では対照群とほぼ同様の反応を示すが，細胞間隙の拡大した腫瘍細胞では全体に染色性が減弱している。扁平上皮癌では細胞質や核に変性を受けずに遊離した腫瘍細胞の細胞質に Con A (+2)，SBA (+2～3)，PNA (+2～3)，RCA-I (+2～3) の反応を認め，破壊されつつある細胞間橋に網状の染色性を認める。剝離

表 3 Etretinate 投与群マウスのレクチン，ケラチン染色性

	腫瘍細胞の空胞化			腫瘍細胞の遊離化		
	基 底 部 腫瘍細胞	空胞細胞	空胞周囲の 腫瘍細胞	基 底 部 腫瘍細胞	好塩基性 腫瘍細胞	好酸性 腫瘍細胞
Con A	1	±	1～2	1	2	1～2
PA/Con A	±	1	1	±	1	1
SBA	±	0	±	1	2～3	2
DBA	±	0	1～2	1	1	1～2
PNA	±	±	1～2	1	2～3	2
UEA-I	±	0	±	±	1	1
UEA-II	±	0	1～2	1	1	1
RCA-I	1	±	1	±	2～3	2～3
WGA	1	±	1	1	2	2
Keratin	±	0	1～2	±～1	2～3	2

表 4 ハムスター正常上皮および発癌過程のレクチン，ケラチン染色性

	正 常 上 皮		乳 頭 腫			扁 平 上 皮 癌	
	上皮細胞	結合組織	基底細胞	棘細胞	過角化細胞	浸潤腫瘍細胞	増殖腫瘍細胞
Con A	2	2	1	2	±	±	1
PA/Con A	1	1	±	2	±	±	2
SBA	3	0	±	2～3	±	2～3	2
DBA	2	±	1	2～3	±	1～2	1～2
PNA	3	0	1	3	±～1	2～3	1～2
UEA-I	3	0	±～1	3	±	1	1
UEA-II	1	1	±～1	1	±	±	±
RCA-I	2	2	1	1～2	±～1	1	2
WGA	2	2	1	2	±	1	1～2
Keratin	2	0	±～1	2～3	1	2～3	2～3

した好酸性を示す角化細胞に Con A (+1～2), SBA (+2), PNA (+2), RCA-I (+2～3) の反応が認められる。基底部腫瘍細胞では弱いレクチン染色(Con A, SBA, UEA-II, WGA)を示す。空胞化の著しい腫瘍細胞ではほとんどが陰性反応を示し、乳頭腫の空胞化した腫瘍細胞のレクチン染色と比較して明らかに染色性が減弱している。腫瘍間質に存在する好酸性腫瘍細胞(角化細胞)のレクチン染色は SBA (+1～2), PNA (+2), RCA-I (+2), WGA (+2) に陽性でこれらの細胞の変性、崩壊とともに染色性は減弱し、遂には細胞膜に反応を残すのみとなる。腫瘍の間質結合組織のレクチン染色は乳頭腫、扁平上皮癌の対照群において大きな差異はみられない。(表3)

b) ハムスター

①正常粘膜上皮および発癌過程の腫瘍組織の所見：正常粘膜上皮細胞では SBA, PNA, UEA-I レクチンが強陽性で Con A, DBA, RCA-I, WGA レクチンは中等

度陽性を示す。結合組織は Con A, RCA-I, WGA レクチンに中等度の反応を認める。

乳頭腫においては表層角化部の各レクチン染色はほとんど陰性である。腫瘍細胞では上部棘細胞層に Con A (+2), SBA (+2～3), DBA (+2～3) が陽性で、下部棘細胞層に PNA レクチンが強い反応を示し、基底細胞層ではレクチン染色は陰性か弱陽性を示す。腫瘍細胞全層にわたって UEA-II (+1), RCA-I (+1～2), WGA (+2) の反応を認める。PA/Con A レクチンは基底膜と上部棘細胞層に顆粒状に陽性反応を認める。UEA-I レクチンは基底細胞層に陰性で増殖した腫瘍細胞に陽性反応を示すが、他のレクチンのように層の分布を示さず不規則な染色性を示すようになる。腫瘍細胞に陽性を示す各レクチン染色は、おおむね細胞質および細胞膜に存在し棘細胞の細胞間橋にも陽性反応を示す。腫瘍間質には Con A (+2～3), PA/Con A (+1), UEA-II (+1), RCA-I (+2), WGA (+1) が陽性である。

表 5 Etretinate 投与群ハムスターのレクチン，ケラチン染色性

	腫瘍細胞の空胞化				腫瘍細胞の遊離化		
	基底部 腫瘍細胞	空胞変性細胞 (核濃縮)	空胞細胞	空胞周囲の 腫瘍細胞	基底部 腫瘍細胞	好塩基性 腫瘍細胞	好酸性 腫瘍細胞
Con A	1	1	±	1～2	1	2	2
PA/Con A	±	0	±	1～2	±	1～2	1
SBA	±	±	±	2～3	±	3	2
DBA	±	±	±	1～2	±	2	1
PNA	±	±	±	2～3	±	2～3	2
UEA-I	±	±	±	1～2	±	1～2	±～1
UEA-II	±	±	0	±	±	1～2	1
RCA-I	1	1	±	1～2	1	2～3	2
WGA	1	1	±	1～2	1	2～3	2
Keratin	±	1～2	0	1～2	1	2～3	2

扁平上皮癌においては増殖腫瘍細胞に Con A (+1), SBA (+2), DBA (+1～2), PNA (+1～2), UEA-I (+1), RCA-I (+2), WGA (+1～2) の反応を認めるが、正常上皮、乳頭腫と比較するとレクチン染色は減弱しさらに不規則な染色性を示すようになる。表層の壊死部では Con A (+2～3), PA/Con A (+1), SBA (+2～3), PNA (+3), RCA-I (+2～3), WGA (+2) の反応を認める。扁平上皮癌では癌真珠形成が著明であるが、角化部周囲の腫瘍上皮細胞に SBA (+2～3), DBA (+1～2), PNA (+2～3), RCA-I (+1), WGA (+1) の反応を示し、角化中心部では DBA (+2), PNA (+2), WGA (+2) が陽性で SBA, PNA レクチンは角化傾向の著しい腫瘍細胞に強い反応がみられる。腫瘍間質の線維性結合組織のレクチン染色は乳頭腫のそれと同様である。(表 4)

② Etretinate 投与後の所見：正常粘膜上皮ではレクチン染色に著変は認められない。乳頭腫において上部棘細胞層に著明な空胞を形成するが、その部位のレクチン染色は大部分が陰性か弱陽性で、下部棘細胞層の腫瘍細胞には Con A (+2), PA/Con A (+1～2), SBA (+2～3), DBA (+1～2), PNA (+2～3) の反応を示し、UEA-I (+1～2) は一部不規則な反応を示す。また細胞間隙の拡大した腫瘍細胞においては、伸展した細胞間橋に SBA, DBA, PNA, UEA-I レクチンが陽性反応を示す。扁平上皮癌においては腫瘍細胞が細胞質、核に強い変性を受けずに遊離しているものでは Con A (+2), SBA (+3), DBA (+2), PNA (+2～3), UEA-I (+1～2), RCA-I (+2～3), W-GA (+2～3) の反応がみられ、破壊された細胞間橋や細胞間物質にも網状に反応がみられる。核濃縮を伴う好酸性腫瘍細胞では Con A (+2), SBA (+2), DBA (+1), PNA (+2), UEA-I (±～1), RCA-I (+2), WGA (+2) の反応を認める。ハムスター特有の所見である核濃縮や空胞

変性した腫瘍細胞では大部分のレクチン染色は陰性か弱陽性で、細胞膜には SBA(+1～2), PNA(+2), RCA-I (+2), WGA (+1) の反応がみられるが、他のレクチンは陰性かもしくは弱陽性である。(表 5)

4. ケラチンの免疫組織化学的所見

a) マウス

①正常表皮および発癌過程の腫瘍組織の所見：正常表皮細胞では全層にわたって細胞質に強陽性反応を示し、毛根上皮も強い反応を認める。乳頭腫の腫瘍上皮では層的分布を示し基底細胞層では弱陽性から痕跡程度の反応を認め、下部棘細胞層では核周囲に中等度の反応があり、上部棘細胞層から顆粒細胞層にかけては細胞質に強陽性反応を認める。真正過角化部では均一に弱陽性で、錯過角化部では一部に顆粒状の陽性反応を示す。棘細胞層の細胞間橋に陽性反応を示す。扁平上皮癌において増殖を示す腫瘍細胞では中等度陽性で不規則な反応を示し、特に大部分は核周囲に反応を認める。腫瘍間質に浸潤していく腫瘍細胞では細胞質に比較的強い反応を示し、癌巣部では角化部周囲の腫瘍細胞に中等度の反応がみられ、角化部の反応は弱い。浸潤した腫瘍細胞の細胞間橋にも反応がみられる。(表 2)

② Etretinate 投与後の所見(写真 2 B, E)：周囲正常表皮細胞には著変を認めない。一部表皮の肥厚した部位では反応が低下している。乳頭腫では上部棘細胞層の空胞内にはほとんど反応がなく、下部棘細胞層の腫瘍細胞に陽性反応を認める。細胞間隙が拡大した部位でもケラチンの反応に大きな変化はなく、おおむね対照群と類似した結果を示す。扁平上皮癌において表層の壊死部は陰性である。遊離した腫瘍細胞では細胞質に反応がみられ、一部に核周囲に中等度陽性を示し、核濃縮に陥り剥離した角化細胞では細胞質に中等度陽性の反応を示す細胞もみられる。増殖した腫瘍細胞の空胞内に反応を認めず、周囲の腫瘍細胞に弱い反応を認める。腫瘍間質に浸

図3 ビタミンAおよび Etretinate の取り込み

潤した腫瘍細胞では強い反応がみられる。(表3)

b) ハムスター

①正常粘膜上皮および発癌過程の腫瘍組織の所見：正常粘膜上皮では基底細胞の基底部と核周囲に弱い反応を認め、棘細胞の細胞質に強い反応を示す。乳頭腫では基底細胞層は弱陽性で、棘細胞層は中等度陽性を示し角化層にも弱陽性反応を認める。扁平上皮癌において基底部腫瘍細胞は陰性で、上皮肥厚を示す部位では不規則でび慢性の反応(+2~3)を示し一部細胞間橋にも反応がみられる。腫瘍間質に浸潤した腫瘍細胞の細胞質に強陽性反応が認められる。(表4)

② Etretinate 投与後の所見：乳頭腫では空胞化した上部棘細胞層にはほとんど反応がなく、下部棘細胞層の腫瘍細胞に中等度の反応がみられる。伸展した細胞間橋に弱陽性反応を示す。扁平上皮癌において壊死部の腫瘍細胞は陰性で、核濃縮を伴った空胞変性の腫瘍細胞の細胞膜に反応がみられる。細胞質や核に変性を受けずに遊離している腫瘍細胞に陽性反応(+2~3)を示す。浸潤増殖している腫瘍細胞の細胞質にび慢性の反応(+2)を認める。基底細胞層および棘細胞層の腫瘍細胞の反応は減弱している。(表5)

5. ビタミンAの臓器への取り込みおよびマイクロオートラジオグラフィー

実験腫瘍、皮膚、腎臓において Etretinate とビタミンAアルコールの両者の取り込み量に有意な差は認められない。肝臓では4時間後にビタミンAアルコールが Etretinate より約2倍以上の取り込みがみられる。また肝臓におけるビタミンAアルコールの取り込みは急激な増加を示すが、その他の臓器は徐々に増加する。腫瘍組織が最も取り込みが少なく、4時間後で Etretinate とビタミ

ンAアルコールともに約600 dpm/mgで、ビタミンAの標的器官とされている正常皮膚組織に比較して、その取り込みは約40%しか認められない。(図3)

³H 標識した Etretinate を用いたマイクロオートラジオグラフィーの所見では30分後に腫瘍周囲の正常真皮結合組織にび慢性に現像銀粒子が認められる。4時間後では30分後より真皮結合組織に多数の現像銀粒子がみられるが、表皮細胞の細胞間隙にわずかに現像銀粒子が認められるのみである。乳頭腫では30分後に腫瘍直下の間質結合組織に現像銀粒子がみられるが、正常表皮の真皮結合組織に比較して少なく、腫瘍上皮細胞にはわずかに現像銀粒子がみられる。4時間後では間質結合組織内の現像銀粒子は増加し、腫瘍細胞においては基底細胞層から棘細胞層の細胞間隙や細胞膜周辺に現像銀粒子が点在してみられる。浸潤増殖した扁平上皮癌では30分後には一部の腫瘍間質に現像銀粒子が認められるが、乳頭腫のそれと比較してさらに減少しており腫瘍間質中の癌巣部の腫瘍細胞にわずかに現像銀粒子がみられるのみである。4時間後では腫瘍間質中にみられる現像銀粒子は増加しており、それとともに腫瘍上皮細胞の細胞間隙や細胞膜周辺に現像銀粒子が増加しているのを認める。

考 察

ビタミンA (VA) は1909年 Stepp が卵黄から抽出した脂溶性物質に生命維持作用のあることを発見し、栄養学上の重要性が指摘された³⁾。VAには脊椎動物の発育、視覚、上皮組織の成長、分化や生殖などの重要な機能に欠くことのできない栄養素として多くの研究がなされている。特にVAには制癌効果のあることがわかり、この分

野における研究が活発になり多くの報告がみられる。元来 VA と癌に関する研究は1926年に藤巻が VA 欠乏動物に胃癌を形成しやすいことを初めて認めて以来、皮膚の角質化、胃腸、肺や泌尿器系上皮に化生が起こりやすく、VA と癌との関係が示唆されるようになった。また VA 欠乏によって生じた前癌状態を VA 投与により正常化に引き戻す作用のあることがわかり¹⁰⁾、さらに疫学的調査等から VA には潜在的な癌を予防する作用があるため chemoprevention という概念が生まれ¹¹⁾、さらにこれを積極的に癌治療に応用しようとする試みが行われた。

VA は肝臓に蓄積されやすく、皮膚の剝離、神経症状や肝障害といったいわゆる VA 過剰症である副作用が出現し、臨床に応用するには大きな問題となった。そのため副作用が少なく抗腫瘍効果の高い VA 誘導体 (レチノイド) の開発研究がなされてきたが VA 酸は代謝、吸収が早く肝臓への蓄積もほとんど認められないことから、多くの VA 酸誘導体が開発された。Bollag⁵⁾ はマウス乳頭腫にレチニルパルミテート (VA エステル) を投与しその有効性を確認しているが、1974 年に Bollag ら⁶⁾ によって合成された Etretinate (Ro 10-9359) は抗腫瘍効果を有するポリエン鎖はそのままで、炭水素環を芳香環に、毒性を強めている末端極性基のカルボキシル基を極性の少ないエチルエステルに置換したもので、毒性の低下と抗腫瘍効果の強化をはかったものである。VA 酸誘導体として口腔粘膜の白板症、乳頭腫、扁平苔癬、ダリエ病、乾癬¹¹⁻¹⁴⁾等の治療にすでに臨床応用されている。マウスの皮膚やハムスターの頬類粘膜に形成した実験癌に Etretinate を投与し、顕著な副作用を発現させることなく明らかな抗腫瘍効果を有することが確認されている⁷⁻¹⁰⁾。また VA には抗癌作用 (anti-tumor effect) だけでなく、抗発癌作用 (anti-carcinogenic effect) を有することが、Rowe ら²⁰⁾のハムスター頬類粘膜癌を使った実験で報告されており、これは癌形成が VA 欠乏時に増加し VA 投与により抑制されるというものである。逆に Levij ら²¹⁾は VA と発癌剤の併用使用によりその発癌効果が増強すると述べている。この発癌促進効果は膜透過性の変化によるものと考えられており、VA が membrane active agents の性質を有するため、このような性質を利用して他剤と VA の併用療法や FAR 療法など臨床的に応用されている^{22, 23)}。

現在 VA の抗癌作用の作用機序については多くの仮説があるが、いまだに確定的なものはない。主な作用機序は次の如く考えられている。(1) RBP (retinol-binding protein), RABP (retinoic acid-binding protein) の有無²⁴⁻²⁶⁾、(2) 糖蛋白質合成への影響²⁷⁻²⁹⁾、(3) 上皮細胞間の細胞接合部と細胞膜への影響³⁰⁻³²⁾、(4) 角化抑制^{4, 33, 34)}、(5) ライソゾーム膜の不安定化^{35, 36)}、(6) ODC (ornithine decarboxylase) 活性の抑制³⁷⁾、(7) 免疫能の賦活^{3, 38)}等である。本論文では上記の作用機序を

検討し、本実験から得られた結果と比較し若干の考察を加えた。

I. レチノイド投与後の組織変化

Etretinate 投与後のヒトの過角化病変や実験癌における組織学的特徴として、(a) 細胞壊死と角化層の剝離、(b) 細胞内の空胞形成、(c) 粘液様物質の分泌および貯留、(d) 上皮細胞の細胞間隙の拡大、(e) トノフィラメント (tono-filament)、デスモソーム (desmosome) およびケラトヒアリン顆粒の減少とギャップ結合 (gap junction) の増加、(f) 炎症性変化等があげられる。

上皮性腫瘍細胞の壊死は VA の毒性、ライソゾーム酵素の放出、細胞膜の不安定化によるものと考えられ、ライソゾームの指標酵素である酸フォスファターゼ活性の上昇が報告されている^{7, 8)}。また VA は界面活性剤様の作用を有し、これが細胞膜の不安定化の一因となる³⁹⁾。本実験でもマウス、ハムスターともに腫瘍表層部の壊死は著明であるが、直接 VA の lysosomal labilizer の作用が働いたかどうかは明らかではない。特に細胞膜の不安定化は大量の投与時に発生し少量の時はむしろ細胞膜を安定化させる働きがあるという報告もされており³⁹⁾、一概にライソゾーム膜の不安定化が作用機序であるとはいえない。角化層の剝離は異常な stratification を示す角化細胞 (keratinocyte) に VA が選択的に作用し正常な状態に引き戻す作用のあることから、本実験でも角化傾向の強いマウス乳頭腫の過角化部では広範囲な剝離が認められ、同時に顆粒細胞層の減少もみられたことと一致する。

Etretinate 投与後、過形成上皮細胞内に空胞形成もしくは空胞変性を認める所見が報告されているが⁴⁰⁻⁴²⁾、本実験でもマウス、ハムスターともに腫瘍の上部棘細胞層と増殖浸潤した腫瘍細胞に空胞形成がみられた。空胞内は PAS 染色陰性で一部に変性崩壊した細胞質が認められ、炎症性細胞の取り込みもみられるが基底部腫瘍細胞にこのような空胞化は認められない。どのような機序で空胞が形成されるのかは明らかでないが、細胞内の空胞に粘液様物質が分泌、貯留されるという所見が報告されており^{40, 41)}、これは VA がムコ多糖類の生合成に影響を及ぼしていることを示唆するものとされている。しかし本実験においては明らかに粘液様物質が分泌、貯留した所見は認められず、これらの空胞が形成された部位から考えると VA が選択的に上部棘細胞層の細胞膜に作用し、そのために細胞質内に何らかの変化が出現したものと考えられる。粘液様物質の分泌および貯留は角化細胞の細胞質内や空胞内のみでなく細胞間隙にも認めたという報告があるが⁴⁰⁻⁴⁴⁾、本実験で観察された細胞間隙には無定形な細胞間物質が認められただけで、PAS 陽性物質の蓄積はみられなかった。それゆえに VA が糖蛋白質生合成に直接影響を及ぼすことは否定できないが、粘液様物質の分泌、貯留による上皮性腫瘍細胞の変性とは考

えられず、VA による腫瘍細胞破壊の変性物質の一部が存在していると思われる。

VA 投与により細胞間隙の拡大、デスモゾームの減少、ギャップ結合の増加等が認められる^{39,40)}。一般に上皮細胞の接合部はデスモゾーム、ギャップ結合、閉鎖結合(tight junction)の様式からなり、特にギャップ結合は組織器官の調整や成長の制御の役割を有しており、癌が形成されると減少、消失し細胞間のシグナルが消失するが、VA 投与によりこのギャップ結合形成を刺激し細胞間の交通が回復し正常化することが注目されている⁴¹⁾。ヒトの角化病変や実験癌においてもギャップ結合の増加、閉鎖結合様構造物の出現、デスモゾームやトノフィラメントの減少が認められている^{30,31)}。しかし日高ら⁴⁰⁾の口腔白板症の電顕所見によると、デスモゾームに変化はなく棘細胞のトノフィラメントやケラトヒアリン顆粒の著明な減少を認めている。また Freeze fracture 法により VA の上皮細胞表面構造に及ぼす影響については次のような研究がみられる。鶏胚皮膚を用いた *in vitro* で VA 投与により閉鎖結合形成とギャップ結合の増加を認め³²⁾、ヒトの基底細胞癌でもギャップ結合の増加、デスモゾームや半デスモゾーム(hemi-desmosome)の減少を認めている^{4,47,48)}。北島ら³⁴⁾も乾癬患者に Etrinate を投与し、デスモゾームの大きさの減少と上皮細胞間に分泌した粘液様物質の出現を認めている。逆に Caputo ら⁴⁹⁾は乾癬患者にレチノイド(Tigason)を投与してもギャップ結合の増加は認めず、上皮細胞間隙の拡大と細胞内空胞化と粘液様物質の蓄積を認めている。本実験でもマウス、ハムスターともに著明なデスモゾームの減少を認め、一部には伸展、破壊されているものもあり腫瘍細胞間隙の拡大は明瞭であった。特に扁平上皮癌において腫瘍細胞が完全に遊離しているのが認められた。これらの変化は棘細胞層に著明にみられ、基底細胞層にはこのような変化はなく、基底膜および半デスモゾームにも著変は認められなかった。これらの所見は粘液様物質の細胞間隙への分泌、貯留による細胞接着の障害によるものではなく、むしろ VA が細胞接合部、特にデスモゾームに直接作用し、その結果、伸展、破壊されたものと考えられる。しかし VA が選択的にデスモゾームに作用しているのか細胞膜構造の一部に作用しているのかは不明であるが、腫瘍細胞が強い細胞障害を受けずに遊離していることから細胞接合部への影響が特徴的な作用と考えられる。また VA の作用が基底細胞に弱く棘細胞に強いことから stratification を示す腫瘍細胞に選択的に強い作用が働くものと思われる。

VA 投与による上皮性腫瘍細胞の炎症性変化は免疫能の賦活と関連があり、これは VA がアジュバント(adjuvant)活性を示し、killer T-cell の産生や細胞性免疫を高めるという報告がある^{3,38)}。本実験でも Etrinate 投与により腫瘍間質の炎症性細胞浸潤が広範囲にみられ一

部表層にまでその影響が及んでいた。ハムスターに比較してマウスにおいてその作用が強く肉眼的に一塊として腫瘍が脱落したことよりこれらの作用機序も関係しているものと思われる。

VA 投与により ODC(ornithine decarboxylase)活性を抑制することが知られている³⁷⁾。ODC は核融合合成に必要なポリアミン(polyamine)の形成を制御し細胞の増殖や分化に関係が深く、実験皮膚癌でも形成初期に ODC 活性が上昇することが認められている⁵⁰⁾。VA は発癌の腫瘍プロモーターの抑制効果をはたし、その結果として癌化を抑制する。しかもこの ODC 誘導阻害作用は VA 酸が最も強く VA 酸誘導体の投与は上皮癌の発生予防に役立つとされている³⁷⁾。

II. VA と上皮細胞の糖鎖構造の変化について

VA は糖蛋白質の生合成に関与し、この作用は抗癌作用と関係がある。糖蛋白質は成長、細胞の分化、細胞認識、細胞接着や悪性腫瘍を含む多くの疾患の発生過程において重要な役割を有している。一般に糖蛋白質は、(1) sialic acid, galactose, N-acetyl-galactosamine からなり O-glycoside 結合したムチン型糖蛋白質、(2) sialic acid, galactose, N-acetyl-glucosamine, mannose からなり N-glycoside 結合した血清型糖蛋白質、(3) mannose と core 部分の di-N-acetyl-xytobiase のみからなるマンノース-グルコサミン型糖蛋白質に分類され、それぞれの糖鎖構造に特異的に結合するレクチンを用いて組織化学的に細胞質および細胞膜の糖蛋白質を証明することができる⁵¹⁻⁵³⁾。この方法を応用することにより細胞の分化、上皮細胞の成熟過程、悪性化をレクチン結合性(糖鎖構造)の変化でとらえ比較検討することができる⁵⁴⁻⁵⁶⁾。また上皮の異型性、前癌状態から癌化するとレクチン染色が不規則となり¹⁶⁾、一般に癌化すると細胞膜の糖鎖構造の不全が認められている³⁰⁾。本実験でもレクチンを用いてマウス、ハムスターの正常上皮および発癌増殖した乳頭腫、扁平上皮癌の糖鎖構造を検討した。マウス、ハムスターの動物の差によるレクチン染色の著明な違いは認められない。一般に正常上皮と肥厚上皮では基底細胞層の反応は弱く棘細胞層から顆粒細胞層にかけては反応が強くなり、表層角化部ではほとんど陰性反応を示した。Con A, UEA-II, RCA-I を除いては層の分布を示し癌化に伴ってレクチン染色は減弱し不規則となる。特に UEA-I レクチンは上皮の異型性や悪性転化に敏感で上皮肥厚部にすでに不規則な染色性を示し、扁平上皮癌ではレクチン染色性の著明な減少を認めた。また SBA, PNA レクチンは角化傾向の強い上皮細胞に反応がみられ、上皮の分化度に左右されやすいレクチンである。このような所見は各種の悪性腫瘍でも報告されており⁶⁰⁻⁶²⁾、レクチンが surface marker として十分に有用性を示すことが証明された。

古くから VA 欠乏によるムチン分泌の低下により、VA

は複合糖質の生合成に関与しているものと考えられていた⁶³⁾。DeLuca ら⁶⁴⁾はラット小腸を対象にして [¹⁴C] グルコサミンの糖蛋白質への取り込みを検討しているが、VA 欠乏では [¹⁴C] グルコサミンの取り込みが著明に減少し、VA 投与により正常レベルまで取り込みが回復したと述べている。同様に Kim ら⁶⁵⁾はマウス培養角膜への [¹⁴C] フコースや [¹⁴C] グルコサミンの取り込みが VA の量により左右されることを明らかにしている。VA の糖蛋白質糖鎖形成には次のような3つの段階がある^{66,67)}。(1) レチノールリン酸マンノース (MRP)。MRP の産生にレチノールとともに ATP が要求されレチノールのリン酸化が介在している。(2) MRP より糖蛋白質へのマンノースの転移。グリコシルトランスフェラーゼにより糖 donor へ転送し糖鎖に直接結合する。VA 酸でも細胞内で水酸基をもつ化合物に変化した後、これがリン酸化されレチノールリン酸と同様マンノースの受容体として作用する。(3) レチノールリン酸ガラクトース。レチノールリン酸はマンノースばかりでなく、UDP-Gal からガラクトースを取り込む受容体としても作用する。上記の生合成に関与する酵素活性は皮膚で最も強く肝臓ではほとんど認められない。以上のことより VA が糖蛋白質生合成に何らかの影響を及ぼすことが明確になったが、Mahrle ら⁶⁸⁾は *in vitro* での角化細胞の変化をレクチンを用いた実験で行っている。すなわち FITC 標識した SBA, DBA, PNA レクチン染色が VA 酸によって著しく減少し、ガラクトサミンとガラクトシル基を含む細胞表層の糖が欠乏していることを示している。Elias ら⁶⁹⁾はマウス皮膚においてレクチン反応が層的分布を示し、角化層でその反応が突然消失しているのはグリコシダーゼの作用によるものとしレチノイド投与でこのグリコシダーゼに影響を及ぼし糖蛋白質生合成、特に N-acetyl-glucosamine 量が増加していると述べている。また Patt ら⁷⁰⁾はハムスター線維芽細胞の培養で、VA の添加が形質膜の糖脂質や糖蛋白質の合成パターンを著明に変化させることを見出ししている。これらの VA と糖蛋白質生合成との関係で、どのような機序の抗癌作用が推測されるかを、レクチンを用いて腫瘍細胞の糖鎖構造の変化で検討したい。さらに Etretnate 投与後の組織変化で出現した空腔内物質や上皮細胞間物質についても考察を加える。Etretnate の投与により著効を示した腫瘍部位においてはおおむねレクチン染色は減弱しており、特に細胞間隙が拡大した腫瘍細胞ではその傾向が強い。しかし Etretnate の効果が認められなかった腫瘍細胞や周囲正常上皮のレクチン染色は、対照群のそれらと比較して著変はなく元来から扁平上皮癌のレクチン染色は不規則である。このことより VA はすべての腫瘍上皮に作用するのではなく、むしろ特定の部位の腫瘍細胞、たとえば棘細胞層に相当する腫瘍上皮細胞に選択的に作用するものと考えられた。粘液という物質の貯留に

より細胞接着が阻害されるという報告がみられるが⁸⁰⁾、この部位に一致してレクチン染色が増加した所見はなく、むしろ糖鎖構造の減弱による細胞膜の接着性の低下が本実験で示唆された。また一部の遊離細胞に強い染色性を認め、組織的にも細胞障害を受けていない腫瘍細胞が認められることから、細胞接合部に対する特定の影響が考えられた。腫瘍上皮の空腔内の物質にも Con A, SBA, PNA, RCA-I レクチンが認められたが、細胞の破壊された顆粒状物質にこれらのレクチン反応が残存しており、PAS 陰性の結果を考え合わせると粘液様物質の分泌、貯留によるものとは明らかに異なっている。

III. VA による角化抑制

一般に細胞質骨格には microtubule (20~25 nm diameter), microfilament (5~6 nm) と cytoskeletal filament (intermediate-sized filament, 7~11 nm) の微小線維が含まれている。このような線維性蛋白質は細胞の外形、運動性の維持、細胞膜蛋白質の移動の調整、染色体や細胞突起の運動、細胞分裂、細胞増殖の調節をつかさどっている^{71,72)}。特に表皮細胞の intermediate-sized filament のケラチン(keratin)は、トノフィラメントやデスモゾームと深い関係があり皮膚の構造維持の役目を有する。Schlegel ら⁷³⁾はヒト正常組織でのケラチン分布を検索しているが、扁平上皮細胞に陽性反応を認めており上皮の分化や扁平上皮化生によりケラチンの局在が変化することを述べている。Sun ら^{74,75)}も各臓器の上皮細胞のケラチンについて報告しているが、表皮、角膜、舌、食道等の重層扁平上皮には強い反応を認めている。ラット、マウスの組織細胞や培養細胞の上皮細胞にも同様の反応がみられ免疫学的交叉反応が認められる。それゆえにケラチンは上皮細胞由来のマーカーとして炎症性、前癌、悪性病変における上皮細胞由来の鑑別に有用とされており、上皮の分化や病的状態によるケラチンの変化を利用して口腔粘膜の白板症や皮膚の扁平上皮癌の鑑別診断の一助としている⁷⁶⁻⁷⁹⁾。またマウス皮膚に形成した実験癌では高分子量のケラチン反応が消失するので、腫瘍の増殖や悪性転化の指標として有用であるという報告もみられる⁸⁰⁾。本実験で用いたケラチンは DAKO の抗ヒトケラチン (ヒト足底角化上皮由来の total keratin) でマウス、ハムスターの皮膚および粘膜発癌過程の上皮変化に応用した。乳頭腫では基底部腫瘍細胞には弱陽性で上部棘細胞層や顆粒細胞層に強い反応が認められた。扁平上皮癌では不規則な反応がみられ、特に細胞質に均一に染色されず核周囲に強い反応が認められた。浸潤した腫瘍細胞のなかで強い染色性を示すものがあつた。マウス、ハムスターともに上皮細胞間橋に陽性反応が認められた。以上より上皮の癌化、悪性化に伴いケラチンの細胞内分布も変化しているが、レクチン染色のように悪性化とともにその反応の著明な減弱は認められない。むしろ腫瘍間質に浸潤した腫瘍細胞や乳頭腫の顆粒細胞層に

強い染色性を示すことから、角化の程度に対応しているものと思われ、total keratin は角化のマーカーとして有用性があることを確認した。

VA が角化細胞に影響を及ぼすことは古くから報告されている⁸³⁾。また従来の報告や本実験の結果よりトノフィラメントやデスモゾームの減少がみられ、細胞接着の低下が認められた。Logan⁸¹⁾はこうした VA の作用を anti-keratinizing effect と命名した。これは異常な角化を正常な状態に引き戻す作用もあり、Staquet ら⁸²⁾は乾癬患者に Etretinate を投与しケラチンの電気泳動パターンの分析を試みているが、臨床症状の改善とともにケラチンパターンも正常化されるという報告を行っている。Smith⁸³⁾は培養での鶏胚皮膚の VA の影響を検討しているが、VA 投与によりシスチン蛋白質の生合成が減少しケラチン蛋白質の生合成も阻害されることを示している。Fuchs ら⁸⁴⁾も培養系を用いて VA 濃度と角化細胞の分化調節の関係を検索しており、VA 投与により terminal differentiation にあらわれてくる高分子量 (67 K) のケラチン生合成は阻害され、低分子量 (40 K, 52 K) のケラチン生合成は促進されることを述べている。以上のことより VA は角化に影響を及ぼすが実験病に Etretinate を投与し直接その影響をケラチン染色を用いて検索した研究は少ない。本実験では作用機序の1つである角化抑制について検討した。正常上皮においては、角化細胞の stratification に応じて層的なケラチン染色性を示すが癌化に伴って不規則な染色性がみられ、このことは扁平上皮癌は角化異常の1つとしてとらえることができ、VA はこのような角化異常を示す未角化部の腫瘍細胞に強く作用し、正常な上皮細胞にはほとんどその影響を及ぼさない。それゆえに Etretinate が効果を示さなかった腫瘍細胞や基底部腫瘍細胞には大きな変化はなく、Etretinate により変性崩壊した腫瘍細胞ではその反応は減弱しており、VA が角化抑制に作用しているものと思われる。

IV. Etretinate の代謝および作用部位について

VA エステルとして食物に含まれる VA は腸内でレチノールとなり、また pro-VA は β -carotene-15, 15'-dioxygenase によってレチナールとなって吸収される。レチノールおよびレチナールは小腸で再び飽和脂肪酸とエステル化されカイロミクロンとともに肝臓に運ばれる。血中の分泌、運搬は (1) レチノール-RBP 系、(2) レチニル・エステル-リポ蛋白質系、(3) VA 酸-アルブミン系によってなされている⁸⁵⁾。生体内のレチノールはほとんどすべて RBP と結合しており RBP レセプターを有する上皮細胞にのみ反応し、体液中に急激な VA 増加が起こっても VA 中毒を防止する役割があると考えられている^{85, 86)}。RBP や RABP によって運搬されたレチノールや VA 酸は末梢細胞のそれぞれのレセプターを介して cytosol retinol-binding protein (CRBP) と cy-

tosol retinoic acid-binding protein (CRABP) となり、上皮細胞の膜構造に結合し生理活性作用を示す⁸⁷⁾。さらにレチノイドの作用を媒介する結合蛋白質の重要性は、胎生期と成熟期の細胞あるいは各組織間の結合蛋白質量の違いによるものと考えられる^{84, 88)}。CRBP は一貫して胎児、成熟した細胞に存在するが、CRABP は胎生期のみに存在し成熟すると CRABP が消失する (脳、眼、皮膚は例外)。これは CRBP や CRABP が年齢特異性や組織特異性を有し、主に細胞分化の維持に関係していると考えられている。また細胞膜のレセプターを介して CRBP, CRABP に結合する作用はステロイドホルモン様のメカニズムと類似しており、細胞質内では核内に移行し直接 RNA 合成に関与するという報告もみられる⁸⁹⁾。これらの RBP や RABP はラジオイムノアッセイにより定量でき、この方法を利用してヒトの腫瘍や実験病における RBP, RABP 量を測定している。Bichler ら⁸⁹⁾は頭頸部領域の悪性腫瘍の37例中28例に RABP の存在が認められ、一部の咽頭、喉頭粘膜にも存在していることを示した。Ong ら⁹⁰⁾はラット大腸癌で RBP, RABP を測定したが、RABP には大きな変化はみられなかったが RBP は実験腺癌で著しく高い値を示した。Sani ら⁹¹⁾は RABP は上皮に存在するが結合組織には認めていない。また Rattanapanone ら⁹²⁾は家兎乳頭腫で CRABP を測定し、正常家兎皮膚と比較して高い値を示している。以上のことより上皮由来の細胞には結合蛋白質が存在していることは間違いない事実と考えられる。本実験においてもマウス、ハムスターの Etretinate に対する感受性の差異は結合蛋白質の相違によるものと考えられる。

Etretinate は構造上 VA 酸誘導体の1つであり他の VA 酸と同様の代謝、排泄が行われるものと推測される。VA 酸は経口投与すると代謝されずに直接門脈系で吸収され、血中でアルブミンと結合して運搬される。レチノールのように結合蛋白質が存在しないために非特異的に界面活性剤様の働きを示すが、その代謝速度は速く肝臓への蓄積も認められない。日本ロシュ K.K. の Etretinate 製品説明によるとラットの経口投与では1時間後にピークがきて、後はゆっくりと吸収されている。ヒトの場合でも3~4時間後にピークがきて速やかに吸収、排泄される。組織内分布においてラットでは6時間後に肝臓に13.5~16.9%の放射能活性を認め、腎臓、肺、大脳では0.3%以下であった。本実験でも³H-VA アルコールと³H-Etretinate を用いてマウスの腫瘍、皮膚、腎臓、肝臓の各組織の取り込みを行った。肝臓では VA アルコールが Etretinate より蓄積が認められ、4時間後で約2倍の取り込みがみられ、Etretinate の方が肝臓への蓄積が少ない。その他の組織 (腫瘍、皮膚、腎臓) では VA アルコール、Etretinate とともにその取り込み量に著明な差異は認められず、むしろほとんど同じように吸収されて

いるものと考えられる。RBP や RABP は正常皮膚よりも腫瘍組織に高い値を示すといわれているが^{24,25}、今回の実験では VA アルコール、Etretinate とともに腫瘍は正常皮膚の約半分の取り込みしかみられなかった。皮膚が VA の標的器官とされているが皮膚由来の上皮性腫瘍は皮膚のごとき特異性は保持していないように思われる。

VA が肝臓で貯蔵されることは前述したがそれが Ito 細胞 (ビタミンA貯蔵細胞) であると同定できたのは最近のことで、広沢ら²²が ^3H 標識した VA を用いたオートラジオグラフィーにより初めて実証した。肝臓内の VA 局在を検討する方法として紫外線を利用した蛍光顕微鏡の方法と塩化アンチモンなどによる呈色反応を応用した組織化学的方法があるが、感度、特異性に問題があり凍結切片を用いるため正確な組織内分布が把握できず、長い間 kupffer 細胞がその貯蔵細胞と誤認されていた。そこで直接 ^3H 標識した VA を動物に投与し、その RI の取り込まれた細胞をオートラジオグラフィーで観察した。間質で VA を取り込み脂質滴として貯蔵する細胞は、共通の形態学的特徴を持つことから VA 貯蔵細胞系という概念を提唱した^{23,24}。しかしこの方法にも問題があり VA が脂溶性のため組織の固定、脱水、包埋過程で多量の VA が溶出移動することがあり、そのために大量投与もしくは事前に VA 欠乏状態にしておくなどの工夫がされている。本実験のオートラジオグラフィーを行うにあたって上記の技術的な問題があり、またパラフィン切片によるオートラジオグラフィーでは全く反応がみられないために、著者は凍結切片によるオートラジオグラフィーを行った。しかしこの方法では標本作製中の VA の溶出移動といった問題がなくなる反面、凍結切片のために切片の厚さが大で、現像銀粒子の正確な局在が不明瞭になるといった問題が生じた。VA 貯蔵細胞は肝臓、肺、腸およびその他の消化管壁、脾臓、リンパ節、副腎、膀胱、子宮などの間質にみられ²²⁻²⁵、その他に山本ら²⁶が皮膚真皮にも認めている。実際 Etretinate が腫瘍細胞のどの部分に取り込まれているかを検討するためにオートラジオグラフィーを用いた研究は寡聞である。本実験では30分後にすでに正常真皮結合組織や腫瘍間質に現像銀粒子が認められ、4時間後では腫瘍細胞間隙や細胞膜周辺に現像銀粒子が認められた。さらに組織学的所見やレクチン結合性等の結果から Etretinate は直接、細胞間橋および腫瘍細胞膜に到達し、細胞質内への取り込みが認められなかったことを考え合わせると、Etretinate の抗癌作用は細胞接合部との細胞膜への影響によるものと考えられた。

結 論

マウス皮膚癌およびハムスター頬囊粘膜癌に対する Etretinate (Ro 10-9359) の影響を肉眼的、病理組織学

的、糖鎖およびケラチンの組織化学的観察により検討した。さらに放射性同位元素を利用した主要組織 (腫瘍、皮膚、腎臓、肝臓) への取り込みおよびマイクロオートラジオグラフィーによる観察を合せて行った。

1. 肉眼的変化

Etretinate 投与によりマウス皮膚癌は一塊として剝離、脱落し、ハムスター頬囊粘膜癌では表層から壊死、融解を繰り返しながら縮小するのが認められた。腫瘍の縮小および増殖抑制効果はハムスター頬囊粘膜癌に比較して著しい角化傾向を示すマウス皮膚癌の方が強い。

2. 病理組織学的変化

マウス皮膚癌では過角化層の剝離、脱落を認め、ハムスター頬囊粘膜癌では表層部の壊死、融解を示すのが特徴であった。マウス、ハムスターともに実験上皮癌の腫瘍細胞間橋は減少し、一部に伸展や破壊像がみられ細胞間隙の拡大が認められた。さらに経時的に腫瘍細胞は遊離し、顆粒細胞層から棘細胞層にかけて大小不同の空胞形成を認めた。基底部腫瘍細胞には著変はみられない。癌病巣の細胞間隙および空胞内には PAS 陽性物質は認められなかった。

3. 糖鎖構造の変化

レクチン染色は正常上皮では層的分布を示すが悪性化に伴い不規則な染色性を示し減弱した。Etretinate の著効を示した腫瘍部位では対照群の腫瘍細胞と比較してレクチン染色はさらに減弱し、腫瘍組織の細胞間隙や空胞内に弱いレクチン反応が認められるのみであった。Etretinate の効果を認めなかった腫瘍細胞や周囲正常上皮のレクチン染色は対照群と比較して著変を認めなかった。Etretinate は腫瘍細胞膜の糖鎖構造に影響を及ぼすものと考えられた。

4. 免疫組織化学によるケラチンの変化

角化傾向の強い腫瘍上皮細胞に強陽性反応を認め、一部浸潤した高分化型の腫瘍細胞にも反応が強く、ケラチンは角化上皮細胞のマーカーとして有用であった。Etretinate の効果を示した腫瘍細胞ではケラチン反応は減弱し、レクチン染色と同様に著効を示さなかった部位では対照群と比較して著変はなく、Etretinate はある特定部位の腫瘍細胞に作用し、角化を抑制するものと推測された。

5. Etretinate の取り込みおよびマイクロオートラジオグラフィーの所見

肝臓において Etretinate はビタミンAアルコールと比較して約半分の取り込みを示し、両者は皮膚および腫瘍においてはほぼ同様の取り込みを示した。また腫瘍組織は正常皮膚の約40%の取り込みを示した。マイクロオートラジオグラフィーによる観察では経時的に腫瘍細胞の細胞間隙および細胞膜周辺に現像銀粒子を認め、腫瘍細胞の細胞質への明確な取り込みは認められなかった。以上の所見から Etretinate は腫瘍細胞の細胞接合部および細

胞膜に作用しているものと考えられた。

本研究にあたり終始ご懇篤なご指導、ご校閲を賜った森昌彦教授に深甚なる謝意を表します。また、終始ご協力いただいた本学口腔外科学教室各位に感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第38回日本口腔科学会総会（昭和59年5月17日、東京）、第8回日本頭頸部腫瘍学会（昭和59年6月21日、久留米）および第43回岐阜歯科学会例会（昭和59年9月22日、岐阜）において発表した。

引用文献

- 1) 遠藤英也：Vitamin A と癌。癌と化学療法 6：203-212 1979.
- 2) Sporn, M.B. and Newton, D.L.: Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed Proc* 38: 2528-2534 1979.
- 3) Lotan, R.: Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 605: 33-91 1980.
- 4) Elias, P.M. and Williams, M.L.: Retinoids, Cancer, and the skin. *Arch Dermatol* 117: 160-180 1981.
- 5) Bollag, W.: Therapy of chemically induced skin tumors of mice with vitamin A palmitate and vitamin A acid. *Experientia* 27: 90-92 1971.
- 6) Bollag, W.: Therapeutic effects of an aromatic retinoic acid analog on chemically induced skin papillomas and carcinomas of mice. *Eur J Cancer* 10: 731-737 1974.
- 7) Mori, M. and Kobayashi, K.: Histochemical studies on the effect of antitumor retinoid (Ro 10-9359) on chemically-induced epithelial tumors of the mouse skin. *Cell Mol Biol* 27: 27-37 1981.
- 8) 小林一光, 二宮富久, 他：ビタミンA酸誘導体 (Ro 10-1670, Ro 10-9359) の実験上皮癌に対する腫瘍増殖抑制効果。癌と化学療法 9: 457-466 1982.
- 9) 二宮富久, 小林一光, 他：実験上皮癌に対する Etretinate (Ro 10-9359) の制癌効果。日口外誌 29: 829-835 1983.
- 10) 森田悦弥：実験上皮癌に対する Retinoid (Ro 10-1670), Bleomycin および 5-Fluorouracil の局所塗布制癌効果に関する研究。日口外誌 29: 1806-1825 1983.
- 11) Orfanos, C.E.: Oral retinoids-present status. *Br J Dermatol* 103: 473-481 1980.
- 12) Cordero, A.A., Allevato, M.A.J., et al.: Treatment of lichen planus and leukoplakia with the oral retinoid Ro 10-9359. Ed by Orfanos, C.E., et al., Retinoids, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 273-278.
- 13) Koch, H.F.: Effect of retinoids on precancerous lesions of oral mucosa. Ed by Orfanos, C.E., et al., Retinoids, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 307-312.
- 14) 松浦正朗, 瀬戸皖一, 他：ビタミンA酸誘導体 Etretinate (Ro 10-9359) の口腔白板症、扁平苔癬および乳頭腫に対する治療効果—多施設における臨床的検討。日口外誌 29: 379-389 1983.
- 15) Katsuyama, T. and Spicer, S.S.: Histochemical differentiation of complex carbohydrates with variants of the concanavalin A-horse radish peroxidase method. *J Histochem Cytochem* 26: 233-250 1978.
- 16) Hyun, K.H., Nakai, M., et al.: Histochemical studies of lectin binding patterns in keratinized lesions, including malignancy. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 402: 337-351 1984.
- 17) Stumpf, W.E.: Techniques for the autoradiography of diffusible compounds. Ed by Prescott, D.M., Methods in Cell Biology, Vol. VIII, Academic Press, New York, 1976, p 171-193.
- 18) 水平敏知：オートラジオグラフィスペース肉眼から電顕まで。水平敏知編, 第1版, 医歯薬出版, 東京, 1982, 230-233頁.
- 19) Lasnitski, I.: Reversal of methylcholanthrene-induced changes in mouse prostates *in vitro* by retinoic acid and its analogues. *Br J Cancer* 34: 239-248 1976.
- 20) Rowe, N.H. and Gorlin, R.J.: The effect of vitamin A deficiency upon experimental oral carcinogenesis. *J Dent Res* 38: 72-83 1959.
- 21) Levij, I.S., Rwomushana, J.W., et al.: Enhancement of chemical carcinogenesis in the hamster cheek pouch by prior topical application of vitamin A palmitate. *J Invest Dermatol* 53: 228-231 1969.
- 22) 小宮山莊太郎, 広戸幾一郎, 他：5-FU, Vitamin A, Radiation 併用療法 (FAR 療法) に関する研究。耳鼻 22: 388-394 1976.
- 23) Thatcher, N., Blackledge, G., et al.: Advanced recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 46: 1324-1328 1980.
- 24) Sani, B.P. and Corbett, T.H.: Retinoic acid-binding protein in normal tissues and experimental tumors. *Cancer Res* 37: 209-213 1977.
- 25) Mehta, R.G., Cerny, W.L., et al.: Distribution of retinoic acid-binding proteins in normal and neoplastic mammary tissues. *Cancer Res* 40: 47-49 1980.
- 26) Ong, D.E., Goodwin, W.J., et al.: Presence of cellular retinol and retinoic acid-binding proteins in epidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Cancer* 49: 1409-1412 1982.

- 27) Cavalaris, C.J., Matukas, V.J., et al.: Histochemistry of the mucins of vitamin A produced mucous metaplasia in hamsters. *Arch Oral Biol* 14: 1313-1322 1969.
- 28) Levinson, S.S. and Wolf, G.: The effect of vitamin A acid on glycoprotein synthesis in skin tumors (keratoacanthomas). *Cancer Res* 32: 2248-2252 1972.
- 29) King, I.A. and Tabiowo, A.: The effect of all-trans-retinoic acid on the synthesis of epidermal cell-surface-associated carbohydrates. *Biochem J* 194: 341-350 1981.
- 30) Barnett, M.L. and Szabo, G.: Effect of vitamin A on epithelial morphogenesis *in vitro*. Fine structural changes in explants of adult mammalian skin. *Exp Cell Res* 76: 118-126 1973.
- 31) Prutkin, L.: Mucous metaplasia and gap junctions in the vitamin A acid-treated skin tumor, keratoacanthoma. *Cancer Res* 35: 364-369 1975.
- 32) Elias, P.M. and Friend, D.S.: Vitamin-A-induced mucous metaplasia. An *in vitro* system for modulating tight and gap junction differentiation. *J Cell Biol* 68: 173-188 1976.
- 33) Wilkoff, L.J., Peckham, J.C., et al.: Evaluation of vitamin A analogs in modulating epithelial differentiation of 13-day chick embryo metatarsal skin explants. *Cancer Res* 36: 964-972 1976.
- 34) Kitajima, Y. and Mori, S.: Effects of retinoid (Ro 10-9359) on the plasma membrane of keratinocytes in patients with psoriasis. A freeze-fracture analysis. *J Invest Dermatol* 80: 174-180 1983.
- 35) Jones, R.J.: Vitamin A and lysosomes. *Nutr Rev* 24: 240-244 1966.
- 36) Rundell, J.O., Sato, T., et al.: Lysosomal enzyme release by vitamin A in L 1210 leukemia cells. *JNCI* 52: 1237-1244 1974.
- 37) Verma, A.K.: Biochemical mechanism of modulation of skin carcinogenesis by retinoids. Ed by Orfanos, C.E., et al., *Retinoids*, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 117-131.
- 38) Dresser, D.W.: Adjuvanticity of vitamin A. *Nature* 217: 527-529 1968.
- 39) Roels, O.A., Anderson O.R., et al.: Vitamin A and membranes. *Am J Clin Nutr* 22: 1020-1032 1969.
- 40) Schultz-Ehrenburg, U. and Orfanos, C.E.: Light and electron microscopic changes of human epidermis under oral retinoid treatment. Ed by Orfanos C.E., et al., *Retinoids*, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 85-92.
- 41) Ellis, Ch. N., Gold, R.C., et al.: Retinoid-stimulated material in psoriatic epidermis during Ro 10-9359 therapy. Ed by Orfanos, C.E., et al., *Retinoids*, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 93-98.
- 42) Jablonska, S., Wolska, H., et al.: Aromatic retinoids in psoriasis: clinical, histological, histochemical, electron microscopical and immunological investigations. Ed by Orfanos, C.E., et al., *Retinoids*, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 165-173.
- 43) Matter, A. and Bollag, W.: A fine structural study on the therapeutic effect of an aromatic retinoid on chemically-induced skin papillomas of the mouse. *Eur J Cancer* 13: 831-838 1977.
- 44) Marks, R., Finlay, A., et al.: The effects of retinoids on stratum corneum. Structure and function. Ed by Orfanos, C.E., et al., *Retinoids*, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 77-83.
- 45) Weinstein, R.S., Merk, F.B., et al.: The structure and function of intercellular junctions in cancer. *Adv Cancer Res* 23: 23-89 1976.
- 46) 日高淑樹, 田中誠孝, 他: Etretinate (Ro 10-9359) 投与による口腔白板症の微細構造に関する研究. *日口外誌* 29: 253-265 1983.
- 47) Elias, P.M., Grayson, S., et al.: Gap junction proliferation in retinoic acid-treated human basal cell carcinoma. *Lab Invest* 42: 469-474 1980.
- 48) Elias, P.M., Grayson, S., et al.: Influence of topical and systemic retinoids on basal cell carcinoma cell membranes. *Cancer* 48: 932-938 1981.
- 49) Caputo, R., Gasparini, G., et al.: Freeze-fracture study of psoriatic lesions after oral administration of retinoid. Ed by Orfanos, C.E., et al., *Retinoids*, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 325-329.
- 50) O'Brien, T.G.: The induction of ornithine decarboxylase as an early, possibly obligatory, event in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 36: 2644-2653 1976.
- 51) シャロン, N. (大沢利昭訳): 複合糖質—構造, 生合成・機能, 第1版, 学会出版センター, 東京, 1977, 19-49頁.
- 52) 入村達郎, 平野 寛: レクチンの組織化学的応用. 大沢利昭, 森 良一編, レクチン, 第3版, 講談社, 東京, 1979, 74-97頁.
- 53) Ponder, B.A.J.: Lectin histochemistry, Ed by Polak, J.M. and Van Noorden, S., Wright, Psg, Bristol, 1983, p 129-142.
- 54) Brabec, R.K., Peters, B.P., et al.: Differential lectin binding to cellular membranes in the epidermis of the newborn rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 477-479 1980.
- 55) Rittman, B.R., Mackenzie, I.C., et al.: Lectin binding to murine oral mucosa and skin. *Arch*

- Oral Biol 27: 1013-1019 1982.
- 56) Nemanic, M.K., Whitehead, J.S., et al.: Alterations in membrane sugars during epidermal differentiation: Visualization with lectins and role of glycosidases. *J Histochem Cytochem* 31: 887-897. 1983.
 - 57) Hyun, K.H., Sumitomo, S., et al.: Lectin-binding histochemistry of verruca vulgaris and seborrheic keratosis. *Acta Histochem Cytochem* 17: 399-413 1984.
 - 58) Hyun, K.H., Hosaka, M., et al.: Lectin-binding sites in basal cell epitheliomas and carcinomas. *Acta Histochem Cytochem* 17: 505-521 1984.
 - 59) Dabelsteen, E., Vedtofte, P., et al.: Accumulation of a blood group antigen precursor in oral premalignant lesions. *Cancer Res* 43: 1451-1454 1983.
 - 60) Louis, C.J., Szyndra, T., et al.: Lectin-binding affinities of human breast tumors. *Cancer* 52: 1244-1250 1983.
 - 61) Yonezawa, S., Nakamura, T., et al.: Binding of Ulex europaeus agglutinin-I in polyposis coli: Comparative study with solitary adenoma in the sigmoid colon and rectum. *JNCI* 71: 19-24 1983.
 - 62) Böcker, W., Klaubert, A., et al.: Peanut lectin histochemistry of 120 mammary carcinomas and its relation to tumor type, grading, staging, and receptor status. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 403: 149-161 1984.
 - 63) Wolbach S.B. and Howe, P.R.: Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J Exp Med* 42: 753-777 1925.
 - 64) DeLuca, L.M., Schumacher, M., et al.: Biosynthesis of a fucose-containing glycopeptide from rat small intestine in normal and vitamin A-deficient conditions. *J Biol Chem* 245: 4551-4558 1970.
 - 65) Kim, Y.L. and Wolf, G.: Vitamin A deficiency and the glycoproteins of rat corneal epithelium. *J Nutr* 104: 710-718 1974.
 - 66) Adamo, S., DeLuca, L.M., et al.: Mode of action of retinol. *J Biol Chem* 254: 3279-3287 1979.
 - 67) 木幡 陽: ビタミンAと糖蛋白質の生合成. 代謝 18: 451-458 1981.
 - 68) Mahrle, G.O., Wilkinson, D.I., et al.: Effects of retinoids on keratinocytes *in vitro*. Ed by Orfanos, C.E., et al., Retinoids, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 145-152.
 - 69) Elias, P.M., Chung, J.C., et al.: Membrane glycoconjugate visualization and biosynthesis in normal and retinoid-treated epidermis. *J Invest Dermatol* 81: 81s-85s 1983.
 - 70) Patt, L.M., Itaya, K., et al.: Retinol induces density-dependent growth inhibition and changes in glycolipids and LETS. *Nature* 273: 379-381 1978.
 - 71) Evans, D.J.: Intermediate filaments in diagnostic histopathology. Ed by Polak, J.M. and Van Noorden, S., Immunocytochemistry, Wright, Psg, Bristol, 1983, p 295-301.
 - 72) Osborn, M., Altmannberger, M., et al.: Conventional and monoclonal antibodies to intermediate filament proteins in human tumor diagnosis. Ed by Levine, A.J., et al., Cancer cells/1, The transformed phenotype, Cold spring harbor laboratory, New York, 1984, p 191-200.
 - 73) Schlegel, R., Banks-Schlegel, S., et al.: Immunohistochemical localization of keratin in normal human tissues. *Lab Invest* 42: 91-96 1980.
 - 74) Sun, T.T., Shih, C., et al.: Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2813-2817 1979.
 - 75) Sun, T.T., Eichner, R., et al.: Classification, expression, and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: A unifying model, Ed by Levine, A.J., et al., Cancer cells/1, The transformed phenotype, Cold spring harbor laboratory, New York, 1984, p 169-176.
 - 76) Löning, T., Staquet, M.J., et al.: Keratin polypeptides distribution in normal and diseased human epidermis and oral mucosa. Immunohistochemical study on unaltered epithelium and inflammatory, premalignant and malignant lesions. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 388: 273-288 1980.
 - 77) Moll, R., Franke, W.W., et al.: The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24 1982.
 - 78) Thomas, P., Said, J.W., et al.: Profiles of keratin proteins in basal and squamous cell carcinomas of the skin. An immunohistochemical study. *Lab Invest* 50: 36-41 1984.
 - 79) Mori, M., Nakai, M., et al.: Distribution of keratin proteins in neoplastic and tumor-like lesions of squamous epithelium, An immunohistochemical study. *Oral Surg* 59: 63-69 1985.
 - 80) Winter, H., Schweizer, J., et al.: Keratins as markers of malignancy in mouse epidermal tumors. *Carcinogenesis* 1: 391-398 1980.
 - 81) Logan, W.S.: Vitamin A and keratinization. *Arch Dermatol* 105: 748-753 1972.
 - 82) Staquet, M., Faure, M.R., et al.: Keratin

- polypeptide profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with Etretinate (Aromatic retinoid Ro 10-9359). *Arch Dermatol Res* 275: 124-129 1983.
- 83) Smith, K.B.: Early effects of vitamin A on protein synthesis in the epidermis of embryonic chick skin cultured in serum-containing medium. *Dev Biol* 30: 241-248 1973.
- 84) Fuchs, E. and Green, H.: Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 25: 617-625 1981.
- 85) 武藤泰敏: ビタミンAの体内輸送とレチノール結合タンパク質. 日本ビタミン学会編, ビタミン学 I, 東京化学同人, 東京, 1980, 52-62頁.
- 86) Goodman, D.S.: Vitamin A transport and delivery and the mechanism of vitamin A toxicity. Ed by Orfanos, C.E., et al., *Retinoids*, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p 31-39.
- 87) Heller, J.: Interactions of plasma retinol-binding protein with its receptor. Specific binding of bovine and human retinol-binding protein to pigment epithelium cells from bovine eyes. *J Biol Chem* 250: 3613-3619 1975.
- 88) Sporn, M.B., Dunlop, N.M., et al.: Retinyl acetate: Effect on cellular content of RNA in epidermis in cell culture in chemically defined medium. *Science* 182: 722-723 1973.
- 89) Bichler, E. and Daxenbichler, G.: Retinoic acid-binding protein in human squamous cell carcinomas of the ORL region. *Cancer* 49: 619-622 1982.
- 90) Ong, D.E., Markert, C., et al.: Cellular binding proteins for vitamin A in colorectal adenocarcinoma of rat. *Cancer Res* 38: 4422-4426 1978.
- 91) Rattanapanone, V., Tashiro, S., et al.: Cellular retinoic acid-binding protein in virus-induced Shope papillomas of rabbit skin. *Cancer Res* 41: 1483-1487 1981.
- 92) Hirosawa, K. and Yamada, E.: The localization of the vitamin A in the mouse liver as revealed by electron microscope radioautography. *J Electron Microsc* 22: 337-346 1973.
- 93) Yamada, E. and Hirosawa, K.: The possible existence of a vitamin A-storing cell system. *Cell Struct Funct* 1: 201-204 1976.
- 94) 依藤 宏: ビタミンA貯蔵細胞系, 代謝 18: 415-424 1981.
- 95) Kusumoto, Y. and Fujita, T.: Vitamin A uptake cells distributed in the liver and other organs of the rat. *Arch Histol Jap* 40: 121-136 1977.
- 96) Yamamoto, M., Enzan, H., et al.: Fluorescence and electron microscopic studies on the perivascular mesenchymal cells and fibroblasts after vitamin A administration. *Acta Pathol Jap* 28: 513-521 1978.

写真 1 A～F ハムスター頬窩粘膜病変（癌）のエポソ 1 μm 切片 (TB 染色, $\times 400$)

- A: 発癌開始直後のハムスター頬窩粘膜; 上皮細胞の肥厚がみられ, ケラトヒアリン顆粒も認められる。基底細胞層と結合組織との接合部に著変はみられない。
- B: 発癌開始後16週以後のハムスター頬窩粘膜癌; 著明な上皮肥厚を示し, 腫瘍細胞には種々の程度の異型性がみられる。基底膜も一部不規則になっている。細胞間隙が拡大し, 細胞間橋が明瞭に認められる。
- C: Etretinate 投与後 10 日目; 細胞間橋の減少や伸展, 破壊により腫瘍細胞の細胞間隙は著明に拡大している。
- D: Etretinate 投与後15日目の所見; 空胞形成が著明にみられる。空胞内には破壊された細胞質や炎症性細胞浸潤が認められる。周囲の腫瘍細胞の細胞間隙は拡大している。
- E: Etretinate 投与後 7 日目; 下部棘細胞層に相当する腫瘍細胞が遊離している。基底部腫瘍細胞と腫瘍間質の接合部に著変はみられない。
- F: Etretinate 投与後 7 日目; 上部棘細胞層に相当する腫瘍細胞は強い変性や細胞障害を受けずに遊離している。

写真 2 A～F Etretinate 投与群マウス皮膚腫瘍 (2 A, B: 投与後20日目, 2 C～F: 投与後15日目)

- A: 浸潤増殖した腫瘍細胞に punch out 状の空胞形成が認められる (H-E, $\times 100$)。
- B: 空胞内にケラチン反応は見られず, 周囲の腫瘍細胞の細胞質に弱い反応が認められる (ケラチン染色, $\times 100$)。
- C, D: 核濃縮を伴った好酸性腫瘍細胞が剥離, 脱落し遊離しているのが認められる。基底部腫瘍細胞に著変は認められない (H-E, 2 C $\times 100$, 2 D $\times 400$)。
- E: 基底部腫瘍細胞の基底側にケラチン反応を認め, 一部遊離した腫瘍細胞の細胞質に強い反応が認められる (ケラチン染色, $\times 400$)。
- F: 遊離した腫瘍細胞の細胞質および破壊された細胞間橋や細胞間物質に RCA-I レクチンが陽性反応を示す ($\times 400$)。