腺様嚢胞癌による基底膜タンパク質合成の 免疫組織細胞化学的解析

程 瑠

長崎大学歯学部口腔病理学講座（主任：岡邊治男教授）

〔受付：平成2年9月12日〕

Biosynthesis and stromal accumulation of basement membrane molecules in adenoid cystic carcinoma : an immunohistochemical study

Jun Cheng

*Department of Pathology, Nagasaki University School of
Dentistry, 7-1 Sakamoto-machi, Nagasaki 852*
(Chief : Prof. Haruo Okabe)

〔Accepted for publication : September 12, 1990〕

Key words : Adenoid cystic carcinoma / basement membranes / immunofluorescence / immunoperoxidase technique / tissue culture

Abstract : Tissue samples from patients with adenoid cystic carcinoma (ACC) and those with adenocarcinoma (AC) of salivary gland origin were studied by immunohistochemical staining with specific antibodies to the four macromolecules that are present in normal basement membranes (BM): type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan and entactin. In ACC, the four proteins were immunolocalized in different types of extracellular matrix in the tumor, namely pseudocystic spaces, hyaline stroma, and around tumor cell nests. The staining intensity was enhanced by pretreatment with hyaluronidase. The tumor cells of ACC showed a tendency to proliferate with individual cells in contact with the BM and to infiltrate through BM-rich tissues such as peripheral nerves, blood vessels, and skeletal muscles. In contrast, only circumferential staining of tumor cell nests was obtained in AC. Immunostaining with antibodies to BM proteins seemed to be quite useful for differential diagnosis between these two carcinomas. We further intended to confirm that these stromal BM proteins were produced by the ACC parenchymal cells themselves. To this end, we used two cell lines, ACC2 and ACC3, established from human ACC tissues, and determined immunolocalization of the four basement membrane molecules and fibronectin *in vitro*. These proteins were shown to be immunolocalized in the cytoplasm and then in intercellular spaces, as the cells attach, spread, and grow. The results suggest that ACC cells produce BMs and fibronectin, and this basic nature is reflected in its histology and biological behaviour.

緒 言

ヒト唾液腺に発生する腺様嚢胞癌は、病理組織

学的には、腫瘍巣内に多数の嚢胞様構造を形成するのが特徴である。この構造は篩状構造とよばれ、二種類の細胞集簇単位からなることが知られている。第一に、その大部分をしめる単位構造は間質偽嚢胞である。この嚢胞様構造は小型の筋上

皮様細胞で形成され、嚢胞腔は細胞外基質で満たされている。第二は腺管腔様構造で、導管上皮様細胞からなり、管腔内には唾液腺分泌物様好酸性無構造物質が貯留している¹⁻⁶⁾。前者の偽嚢胞は、電顕的には、一層ないし多層の基底膜様構造で内面をおおわれ、内腔に無構造の粘液物質とわずかの膠原線維の断片をいれており、著者らはこれは腫瘍間質の特殊な変性像であることを報告してきた⁷⁻¹²⁾。しかし、この特徴的な偽嚢胞内容物の性状、とくにその構成タンパク質の詳細にはいまだ不明な点がおおく、生化学的方法での解明がまわっていた。また、腺様嚢胞癌の臨床的特徴のうち、ゆるやかな経過、末梢神経にそった進展³⁾、リンパ行性より血行性の転移の優位⁶⁾などは、きわめて興味ある生物学的性格として、注目されてきた。

そこで、今回の研究では、この腫瘍の特異な組織構築と腫瘍細胞の生物学的性格を理解することを目的に、ふたつの実験をおこなった。第一の実験として、IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンの四種の基底膜物質に対する抗体をもちいて、この腫瘍の間質を免疫組織化学的に検索した。その結果、基底膜物質が腫瘍間質に蓄積していることが判明し、腫瘍細胞の基底膜親和性が本腫瘍の基本的な生物学的性格のひとつであることがあきらかになった。また、この免疫染色の外科病理学的应用として、腺癌と腺様嚢胞癌の鑑別診断の可能性を検討した。

しかし、腺様嚢胞癌の間質に豊富な基底膜物質が腫瘍細胞自身によって産生されるのか、間質細胞によるのかどうかは不明であるので、第二の実験では、ヒト唾液腺腺様嚢胞癌由来の株細胞をもちいて、試験管内で腫瘍実質細胞による基底膜物質の生合成を免疫細胞化学的に証明することを計画した。

材料と方法

実験 I

症例：免疫組織化学的染色に使用した症例は、大小唾液腺の腺様嚢胞癌30例を、上海第二医科大学口腔医学院口腔病理学教室のファイルから無作

為に選択した。腺様嚢胞癌症例は、病理組織学的に、Tarpley ら¹³⁾と Perzin ら¹⁴⁾の分類方法を参考にして、ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色標本によって、cribriform type (15例), tubular type (3例), solid type (2例), solid type with necrosis (2例)と mixed type (9例)の五型に分類した。腺癌症例は、WHO 分類 (1972)¹⁵⁾の adenocarcinoma のうち、特殊な分化傾向を有さない腫瘍20例を同ファイルより選択し、tubuloductal type (9例), solid type (4例), mixed type (7例)の三型に分類した。

抗体：本実験に使用した抗体は、四種類の基底膜物質、IV型コラーゲン、ラミニン (P1 fragment)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、およびエンタクチンに対するウサギポリクローナル抗体である。IV型コラーゲンは Kühn らの方法¹⁶⁾によって、ヒトの胎盤から抽出し、ラミニン (P1 fragment) は Risteli & Timpl の方法¹⁷⁾にしたがって、ヒトの胎盤から精製し、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとエンタクチンは Saku ら^{18,19)}が、マウスのEHS腫瘍から、それぞれ抽出精製したものである。抗体はいずれも米国 Stanford 大学医学部病理学教室 Furthmayr 教授研究室および長崎大学歯学部口腔病理学教室で作製され、アフィニティカラムで精製された標品²⁰⁾をもちいた。

免疫組織化学的染色：外科摘出材料を10%フォルマリン固定したのち、パラフィン包埋し、5μmパラフィン連続切片を作製した。タンパク質の非特異吸着を阻止するために、脱パラフィンした切片を5%脱脂粉乳(雪印乳業)/PBS(リン酸緩衝生理食塩水)液で37°C, 30分反応させた。ついで、Sternberger らの酵素抗体法(PAP法)²¹⁾によって免疫染色をおこなった。切片は一次抗体(10-50 μg/ml)で4°C, 17時間反応させ、ヤギ抗ウサギIgG(1:100, Cappel Laboratories, Cochranville, PA, U. S. A.)とウサギPAP(1:100, Cappel Laboratories)でそれぞれ室温1時間反応させた。同時に、もう一組の切片は Leivo らの方法²²⁾にしたがって、300 I.U./ml ヒアルロニダーゼ(ウシ精巣由来, 生化学工業)/0.01M リン酸緩衝液, pH 7.4で, 37°C, 30分処理したのちに免疫染色をおこなった。内因性ペルオキシダーゼの

活性阻止のためには、切片を0.3%過酸化水素/メタノールで、室温30分反応させた。対照実験では、一次抗体のかわりに正常ウサギ IgG をもちいた。反応産物は3, 3'-ジアミノベンチジンで発色させ、核染色はヘマトキシリンでほどこした。

染色結果の評価：陽性の判定は、同一切片上の正常組織、たとえば、血管内皮、血管平滑筋、骨格筋、末梢神経、口腔粘膜上皮、唾液腺導管、腺房などの基底膜の染色強度を参考にしておこなった。腺様嚢胞癌では、嚢胞腔、腺管腔、胞巣周囲、胞巣間質に、腺癌では、胞巣周囲に、それぞれ注目して判定し、各部位での陽性率をもとめた。

実験 II

細胞：細胞は28歳女性の口蓋小唾液腺および49歳男性の耳下腺に発生した腺様嚢胞癌より通法によってそれぞれ単離、株化された二種の細胞系：ACC2, ACC3 をもちいた。これらの細胞株の性格は、すでに、He らが報告している²³⁾。本実験は、これらの細胞株の150代から170代の継代でおこなった。細胞は15%ウシ胎児血清、1%グルタミン、50 μ g/ml ストレプトマイシン、50 I. U./ml ペニシリンをくわえた RPMI-1640 培地で、加湿した5%炭酸ガス環境下で培養した。

細胞増殖度の測定：細胞の増殖曲線は重複培養法²⁴⁾によってもとめた。培養開始細胞数は3~5 $\times 10^4$ /ml の濃度で、1.5ml 密栓つきプラスチックチューブをもちいて、37°C で培養をおこない、24時間ごとに細胞数を3列のチューブについて測定した。細胞外基質の細胞増殖への影響をみるために、基底膜関連タンパク質のひとつファイブロネクチンを培養チューブにコーティングして、細胞数を同様に測定した。ファイブロネクチンは Engvall & Ruoslahti の方法²⁵⁾によって、ヒト血漿から精製した。0.05M トリス緩衝液 (pH 7.4) で30 μ g/ml の濃度に希釈して、4°C, 24時間コーティングをおこなった。

免疫細胞化学的染色：培養細胞 3 $\times 10^4$ を35mm ペトリ皿にうえこみ、24時間ごとに、PLP 固定液で、4°C, 30分固定し、0.2%トライトン X-100で、4°C, 20分反応させて細胞膜透過性をたかめた。ついで、5%脱脂粉乳/PBS で、4°C, 17時間反応させてタンパク質の非特異吸着を阻止したのち、間

接蛍光抗体法によって染色した。抗体反応は一次抗体、二次抗体ともに室温1時間おこなった。同一ペトリ皿をラバーセメントで6分割して同時に多種の染色を進行させた。

抗体：一次抗体には、実験 I で使用した四種類の抗体のほかに、ヒト血漿ファイブロネクチンに対するウサギ抗体をもちいた。このポリクローナル抗体は前述の精製ファイブロネクチンを抗原として作製した。また、細胞形態を観察するために、ヒト足底角質ケラチンに対するウサギ抗体⁵⁾ をもちいた。これらのポリクローナル抗体は長崎大学歯学部口腔病理学教室で調製されたアフィニティカラム精製標品である。いずれも10~50 μ g/ml の濃度で使用した。二次抗体には、ローダミン標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:50, Miles Scientific, Naperville, IL, U. S. A.) をもちいた。

ヌードマウス移植腫瘍：腫瘍細胞 ACC2, ACC3 をそれぞれ3 $\times 10^6$ /0.1 ml の濃度で BALB/c (nu/nu) マウスの背部皮下に移植した。形成された移植腫瘍を切除し、95%エタノールで4°C, 17時間固定後、パラフィン包埋し、5 μ m 連続切片をえた。切片にはヘマトキシリン・エオジン染色のほか、トルイジンブルー染色、アルシアンブルー染色、PAS 染色の特殊染色をほどこし、さらに、前述の基底膜構成分子の免疫染色を PAP 法でおこなった。

結 果

実験 I.

免疫組織化学的染色：腺様嚢胞癌と腺癌組織内の陽性反応の評価は、同一切片上の正常組織の基底膜の陽性反応を確認しながらおこなった。正常組織では、血管内皮細胞下の基底膜、血管平滑筋および骨格筋の基底膜、末梢神経周膜および内膜の基底膜、口腔粘膜上皮下の基底膜、唾液腺腺房および導管の基底膜に注目した。腺様嚢胞癌では、偽嚢胞内と腫瘍胞巣周囲に、腺癌では腫瘍胞巣周囲にそれぞれ注目して、基底膜タンパク質別に、陽性を呈した症例を算定し、陽性反応率とした。ヒアルロニダーゼ処理群と同無処理群の結果の比較は Table 1 にしめた。症例数の不同は、各組織がかならずしもすべての組織切片上に存在し

Table 1 Immunostaining for basement membrane proteins before and after enzymatic treatment

Basement membrane	Number of cases	Positive staining (%)*					
		Type IV collagen		Laminin		Proteoglycan	
		a**	b***	a	b	a	b
Normal							
Vascular endothelium	50	88	100	74	98	53	100
Vascular smooth muscle	44	92	100	98	98	68	100
Striated muscle	20	35	91	42	100	74	83
Peripheral nerve fiber	28	60	90	86	100	96	100
Oral mucosa	21	41	70	25	60	24	35
Salivary gland	26	13	69	44	60	100	100
Neoplastic							
Adenoid cystic carcinoma							
Pseudocyst	30	80	97	57	93	70	97
Periphery of cell nest	30	57	97	30	70	80	97
Adenocarcinoma							
Periphery of cell nest	20	25	65	40	45	80	95

* Percentage of cases with positive staining

**a. No treatment

***b. Treated with hyaluronidase

ないことによる。

ヒアルロニダーゼ処理群と同無処理群を比較すると、正常組織と腫瘍組織のいずれにおいても、基底膜の免疫染色に対するヒアルロニダーゼ処理の効果が大きであることが判明した。しかしながら、その増強率には、抗体によって、また組織によって差異がみとめられた。エンタクチンの陽性率はひくく、他分子との有意義な比較が困難なので、Table 1 には、しめさなかった。以下、具体的な染色結果を正常および腫瘍組織にわけて詳述する。

正常組織：IV型コラゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンの四種類の基底膜分子は、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、末梢神経線維の周膜と内膜、唾液腺の腺房と導管、皮膚と口腔粘膜の上皮の基底膜に陽性であった。しかし、その染色強度には組織によって相違があった。一般に、上皮の基底膜の反応はそのほかの組織よりよわく(24~41%)、とくにヘパラン硫酸プロテオグリカン抗体での染色強度は微弱であった。また、上皮の基底膜はヒアルロニダーゼ処理に敏感ではなく、酵素処理後でも、ヘパラン硫酸

プロテオグリカンの陽性率はわずかに35%であった。対照的に、唾液腺の導管と腺房の基底膜は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン抗体によく反応した。血管、筋肉、神経の基底膜は四種類の基底膜分子抗体のいずれにもたかい陽性率をしめた。また、ヒアルロニダーゼの効果は、骨格筋におけるIV型コラゲンとラミニン染色で顕著であった。

腺様嚢胞癌：腺様嚢胞癌では、四種類の基底膜分子に対する反応様式が、その組織構築の部分によって、ことなっていた。しかし、腫瘍細胞胞巣周囲においては、中等度から強度の陽性反応が共通してみられた。ヒアルロニダーゼ処理は偽嚢胞の染色において、1.2倍（IV型コラゲン）から1.6倍（ラミニン）の増強をしめたが、腫瘍胞巣周囲ではさらに効果が顕著で、ラミニンでは2.3倍もの陽性率の増強があった。以下、組織型別に染色態度の詳細をのべる。

Cribriform type は、組織学的には、小型の多形ないし紡錘形細胞からなる多数の嚢胞様構造が特徴で、そのなかの大部分は間質偽嚢胞である。偽嚢胞腔には、四種類すべての基底膜分子、IV型コラゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカ

Fig. 1 Cribriform type of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for heparan sulfate proteoglycan. Counterstain with hematoxylin. ($\times 135$) Pseudocysts (p), hyaline stroma (s) and peripheral zone of tumor cell nests are strongly labeled.

ン、エンタクチンの陽性反応がみられた。偽嚢胞腔内の染色はびまん性で、微細線維状、格子様、ないし点状を呈した。偽嚢胞周縁はとくにつよい反応で縁どりされていた (Fig. 1)。また、偽嚢胞によって同一抗体でも染色強度がことなっていた。腫瘍細胞巣間の間質には、免疫染色パタンのことなる二種類の部分が存在した。第一は、H. E. 染色では、細胞のきわめてすくない硝子様のもので、基底膜分子の免疫染色では、つよく均質な反応を呈した (Fig. 1)。第二は、H. E. 標本では、線維性の間質とみなされるもので、前者より細胞密度はたかい。腫瘍細胞巣周囲の基底膜は各抗体で陽性であったが、その外側に位置するこの型の間質には、IV型コラーゲン、ラミニン、エンタクチンの各染色はみられなかったが、ヘパラン硫酸プロテオグリカン染色だけは、びまん性かつ

Fig. 2 Cribriform type of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for heparan sulfate proteoglycan. Counterstain with hematoxylin. ($\times 178$) In addition to strong staining of periphery of tumor cell nests, interstitial fibrous tissue is positive.

弱陽性であった (Fig. 2)。偽嚢胞腔と腫瘍細胞巣間質との交通はしばしば観察され、また、硝子様間質と索状腫瘍細胞巣とが交互に配列し、特徴的な唐草模様を呈した (Fig. 3)。

Tubular type では、立方形ないし多角形腫瘍細胞からなる導管様構造が特徴的であったが、充実性ないし索状胞巣もみとめられた。四種類の基底膜分子の免疫染色では、導管周囲は強く反応したが、導管様腔内には、陽性反応がみられなかった (Fig. 4)。H. E. 染色によって tubular type に分類された症例のなかには、あたかも導管状を呈する、篩状構造をとらない単一の偽嚢胞が小型胞巣内に、形成されているものがふくまれていた。これらの症例では免疫染色後、腔内の基底膜分子陽性によって、偽嚢胞の存在があきらかにされた (Fig. 5)。

Fig. 3 Hyaline stroma of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for type IV collagen. Counterstain with hematoxylin. ($\times 135$) Arabesque-patterned stroma, continuous with pseudocysts, is strongly positive for type IV collagen.

Fig. 4 Tubular type of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for type IV collagen. Counterstain with hematoxylin. ($\times 178$) Periphery of ductal structures stain positively in a linear fashion, while luminal contents do not.

Solid type では、シート状に増殖した小型多角形腫瘍細胞からなる充実性胞巣とせまい線維性の間質がみられた。H. E. 染色では不明瞭な多数の小嚢胞が、免疫染色で基底膜分子に対する抗体でそめだされ、一見、充実性の腫瘍胞巣内にも、広範囲な間質の陥入のあることがわかった (Fig. 6)。

Solid type with necrosis では、小型の未分化な腫瘍細胞からなる胞巣が類円形を呈し、線維性間質によってとりかこまれていた。各腫瘍胞巣は中心壊死巣をとまっていた。H. E. 染色では認識困難であった米粒状細胞外基質が、四種類の基底膜分子の免疫染色で強陽性反応をしめし、この組織型を特徴づけた。また、腫瘍細胞胞巣周囲も陽性反応を呈した (Fig. 7)。

腺様嚢胞癌の末梢神経侵襲はよく知られているが、基底膜免疫染色では、神経周膜、神経内膜に

IV型コラゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンの陽性をみとめた。腫瘍細胞が神経周膜に接着し、しだいに内膜へと浸潤していく様子がみられたが、浸潤してきた腫瘍細胞自身の胞巣周囲にも、各基底膜分子陽性反応がみられた (Fig. 8)。同様の所見は、基底膜の豊富な血管壁 (Fig. 9) や骨格筋 (Fig. 10) にもみられることが、この免疫染色であきらかにされた。

腺癌：腺癌は、H. E. 染色では、tubulo-ductal type, solid type と mixed type に分類されたが、基底膜分子の免疫染色による染色パターンはいずれの組織型でも単調で、腫瘍細胞胞巣周囲に陽性反応がみとめられるのみであった。胞巣内に陽性反応はみられなかった (Fig. 11)。ヒアルロニダーゼ処理によって、IV型コラゲンの場合、2.6倍増強の結果がえられた。しかし、ラミニンとIV型コラ

Fig. 5 Tubular type of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for heparan sulfate proteoglycan. Counterstain with hematoxylin. ($\times 178$) Small pseudocysts (arrow) are positive for proteoglycan, whereas true ductal structures (arrow-head) are not.

Fig. 6 Solid type of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for type IV collagen. Counterstain with hematoxylin. ($\times 178$) Immunostaining reveals numerous small pseudocysts within nests of tumor cells, while these pseudocysts are not discernible in hematoxylin and eosin stained sections.

ゲンの最終的な陽性率はヘパラン硫酸プロテオグリカンのそれほどたかくなかった (Table 1)。

実験 II.

移植腫瘍：ヌードマウス皮下に移植した ACC2 および ACC3 細胞は、2～4 週後に、直径 5～20 mm の腫瘍を形成した。形成された腫瘍は、滑沢な線維組織様被膜でおおわれており、周囲皮下組織から容易に剥離できた (Fig. 12)。腫瘍組織の光顕的観察の結果、トルイジンブルー、アルシアンブルー、および PAS 陽性をしめす偽嚢胞の形成がみとめられ、腺様嚢胞癌の性格、すなわち、偽嚢胞形成能を保持した細胞であることが確認された。偽嚢胞腔内、および腫瘍細胞間隙には、四

種の基底膜分子とファイブロネクチンが免疫組織化学的に証明された (Fig. 13)。ACC2 および ACC3 のあいだに明瞭な相違はなかった。以下の実験においても、二種の細胞系でえられた結果は同様であった。

細胞増殖度：Fig. 14 にしめすように、重複培養法によって測定した細胞増殖曲線から、細胞増殖の doubling time は約 36 時間であった。継代後 4～5 日から、カーブのたちあがりが見られ、9 日目で細胞数は 15 倍の 4.5×10^5 までふえて、その後、減少した。培養チューブにファイブロネクチンをコーティングした場合、その doubling time は、無処理群の 1/2 以下の約 16 時間で、4 日目以降のたちあがりも急勾配で、9 日目には、20 倍の

Fig. 7 Solid type with necrosis of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for laminin. Counterstain with hematoxylin. ($\times 135$) Rice grain-shaped staining is characteristic of this type. Periphery of tumor cell nests is also positive.

Fig. 8 Perineural invasion of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for type IV collagen. Counterstain with hematoxylin. ($\times 178$) Perineurium, endoneurium and periphery of invading tumor cell nests show positive staining.

細胞数まで増殖した。しかし、10日以降、細胞数が減少するというパターンは、無処理群と同様であった。すなわち、ファイブロネクチンの存在下で、細胞はよく増殖することが判明した。さらに、プラスチックに培養した細胞に、ケラチン免疫染色をほどこして観察すると、細胞形態が明瞭にめされた。ファイブロネクチンのコーティングされたプラスチックでは、細胞の伸展がいちじるしく、核周囲の束状の線維束や、細胞辺縁の微細な線維構造が観察できた (Fig. 15b) のに対して、コーティングのない場合、個々のケラチン線維の観察は困難なことがおこった (Fig. 15a)。

免疫細胞化学的染色：蛍光抗体法による免疫細胞化学的染色の結果からは、ACC2, ACC3 細胞が、いずれも基底膜構成分子のIV型コラゲン、ラ

ミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンと、基底膜に関連した分子ファイブロネクチンを生合成することが示唆された。すなわち、継代後、まず、細胞質内のびまん性顆粒状の局在、つづいて核周囲に局在の濃縮、その後、細胞間に点状から団塊状、さらには網状の沈着がみられた。これらの細胞外基質成分の生合成と細胞内輸送は、各タンパク質によって時期がことなり、細胞増殖の進行に関連して、おこなわれているようであった。以下に、各タンパク質について、その詳細をのべる。

IV型コラゲン：IV型コラゲンの免疫染色では、継代後1日目、細胞質内には、びまん性、微細顆粒状の蛍光がみられ (Fig. 16a)、2日目から4日目にかけて、細胞質内の陽性反応物のおおきさと

Fig. 9 Vascular invasion of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for heparan sulfate proteoglycan. Counterstain with hematoxylin. ($\times 230$) Basement membranes in hypertrophic arterial wall and of periphery of groups of invading tumor cells are positive.

Fig. 10 Muscular invasion of adenoid cystic carcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain for type IV collagen. Counterstain with hematoxylin. ($\times 178$) Tumor cells infiltration replaces skeletal muscle fibers.

数が増大するのが観察された (Fig. 16b)。これらの蛍光シグナルは小胞体におけるIV型コラーゲンの局在と解釈し、以下、小胞体パターンとよぶことにする。継代後5日目、大部分の細胞の細胞質内の陽性反応がいつせいに核周囲に集中し (Fig. 16c)、ゴルジ装置におけるその局在と解釈した。以下、この蛍光反応をゴルジパターンとよぶことにする。継代後6日目からは、細胞間隙に点状ないし線状の陽性反応物 (Fig. 16d)、さらに細胞表面に、網状の陽性反応物 (Fig. 16e) がみとめられた。細胞外沈着が開始すると、細胞内の蛍光は微弱化し、その後、ふたたび、小胞体パターン、つづいてゴルジパターンがあらわれた。しかし、6日目以降細胞外沈着をしめす蛍光は減弱せず、持続した。

ラミニン：ラミニンの免疫蛍光染色では、上述

のIV型コラーゲンの染色と同様、継代後1日目から、細胞質内には、小胞体パターンとみなされるびまん性顆粒状の陽性反応が出現し、つづいてその増強がみられた (Fig. 16f)。とくに細胞辺縁で蛍光強度のつよい大型顆粒状のシグナルをみとめた。しかし、ゴルジパターンは、IV型コラーゲンより一日はやく、継代後4日目にみられ、5日目には、核周囲の顆粒状の蛍光が増強した (Fig. 16g)。細胞間の点状ないし線状の陽性反応は、IV型コラーゲン同様、継代後6日目でみとめられた。さらに、細胞表面には、網状の陽性反応物がみられた (Fig. 16h)。8日目以降、小胞体パターン、ゴルジパターンもくりかえして出現した。

ヘパラン硫酸プロテオグリカン：ヘパラン硫酸プロテオグリカンの免疫蛍光染色では、IV型コラ

Fig. 11 Solid type of adenocarcinoma. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Immunoperoxidase stain with type IV collagen. Counterstain with hematoxylin. ($\times 135$) Only periphery of tumor cell nests are stained. There is no positive reaction within these groups of tumor cells.

Fig. 12 Transplanted tumor (ACC2) in the back of a BALB/c (nu/nu) mouse. A well encapsulated tumor is located in the subcutaneous layer.

Fig. 13 Histology of transplanted tumor. a) Hematoxylin and eosin stain. b) Alcian blue (pH 2.5) stain. Counterstain with nuclear fast red. Formation of pseudocystic structures is obvious in the tumor tissues. c) Immunoperoxidase stain for heparan sulfate proteoglycan. Counterstain with hematoxylin. ($\times 178$) Pseudocystic spaces stain positively for Alcian blue and basement membrane molecules.

ゲン染色の結果にもっとも類似して、細胞質内のびまん性で顆粒状の小胞体パターンが継代後1日目では出現し (Fig. 16i), その後増強したが、継代後5日目には、ゴルジパターンが出現した (Fig. 16j)。

Fig. 14 Growth curve of ACC3 cells with (■) or without (□) the presence of fibronectin, measured by replicated culture method. ACC3 cells were plated in plastic tubes at cell concentration of 3×10^4 in 1 ml complete medium and fed every two days with fresh medium. Another set of plastic tubes were pre-coated with fibronectin at concentration of $30 \mu\text{g/ml}$ for overnight at 4°C before plating cells. Doubling time of proliferation is about 36 hours in uncoated tubes, and about 16 hours in coated tubes.

翌6日目からは、細胞内の蛍光が減弱し、細胞間隙の点状、線状の反応物、ついで団塊状、網状の細胞外沈着物がみとめられ (Fig. 16k), 9日目以降には、細胞外沈着にくわえて、ふたたび、小胞体パタンとゴルジパタンもみられた。

エンタクチン：エンタクチンの免疫蛍光染色では、継代後、1日目から5日目までには、細胞質内の陽性は、ほとんど小胞体パタンでしかみとめられなかった (Fig. 16l)。ただ、この間、ごく小数の細胞ではゴルジパタンと解釈できる蛍光がみられた (Fig. 16m)。しかし、前述の三種のタンパク質のように培養細胞がいつせいにゴルジパタ

Fig. 15 Immunofluorescence stain of ACC2 cells for keratin, with b) and without a) fibronectin precoat. Two days after plating. ($\times 270$) The cells spread much more on fibronectin.

ンをしめすような所見はえられなかった。細胞間と細胞表面の沈着は、やはり継代後6日目からみとめられたものの、大部分は点状と線状の沈着であった (Fig. 16n)。蛍光強度もよく、その量もすくなくかった。また、細胞外沈着の開始後は、細胞質内の小胞体パタン、ゴルジパタンがほとんどみとめられなかった。

ファイブロネクチン：ファイブロネクチンの免疫蛍光染色結果は、前述の四種類の基底膜分子のそれとはややことなり、小胞体パタンが一日おかれて、継代後2日目に出現し、蛍光の顆粒がややおおきく、また、多数みられた (Fig. 16o)。継代後6日目から、ほかのタンパク質とおなじく、細胞間と細胞外の沈着があらわれたが、細胞表面の網状の陽性反応物がきわめて多量にみられた (Fig. 16q)。細胞外沈着の開始まえには、ゴルジパタンが明瞭ではなかったが、継代後8日目以降に、きわめて小数の細胞でゴルジパタンがみいだされ

た (Fig. 16p)。

以上の蛍光抗体法による五種のタンパク質の合成、分泌過程の追跡結果を、Fig. 17 のようにまとめた。小胞体パターンは、IV型コラゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、とファイブロネクチンのすべてで確認できたが、ファイブロネクチンでは、その出現が1日おくれた。ゴルジパタンの出現は、ラミニンが1日先行し、IV型コラゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとともに多数の細胞で明瞭に確認できたが、エンタクチンとファイブロネクチンでは不明瞭であった。6日目ないし7日目以降の細胞外沈着の出現と、細胞内反応の減弱は相関していた。細胞外沈着後、ふたたび小胞体パターン、ゴルジパターンが出現する所見は、IV型コラゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンで共通であった。

考 察

基底膜は上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞などの細胞と結合組織をへだてる膜状の細胞外基質で、細胞の接着、物質の濾過のほか、細胞の分化生長に関与している。基底膜を構成する物質として、現在までにすくなくとも四種のタンパク質：IV型コラゲン²⁶⁾、ラミニン²⁷⁾、ヘパラン硫酸プロテオグリカン²⁸⁾とエンタクチン²⁹⁾がしられる。しかし、これらの分子相互の結合様式、さらに、それらの基底膜構築への役割は、いまだ、明確にされていない。

腺様嚢胞癌の電子顕微鏡的観察によって、その大部分の嚢胞様構造は、細胞外基質の陥入による間質の孤立化であることがわかっていた³⁰⁾。したがって、この構造は、液状物の貯留による真の嚢胞と区別する意味で、偽嚢胞とよばれてきたわけだが、この偽嚢胞が多層化した基底膜様の構造物

Fig. 16 Immunofluorescence stain of ACC3 cells for type IV collagen (a-e), laminin (f-h), heparan sulfate proteoglycan (i-k), entactin (l-n), fibronectin (o-q).

- a) One day after plating. Even and punctate intracellular staining suggests type IV collagen localization in endoplasmic reticulum (ER). (×540)
- b) Two days after plating. Intracellular staining of ER pattern is noticeably enhanced. (×540)
- c) Five days after plating. Enriched focal paranuclear staining suggests type IV collagen localization in Golgi apparatus. (×540)
- d) Six days after plating. The cells are nearly confluent. Granular and thread-like extracellular aggregations of immunofluorescence for type IV collagen is observed, while intracellular staining is decreased. (×540)
- e) Eight days after plating. The cells are in confluency. Thick network of immunofluorescence suggests extracellular deposition of type IV collagen. (×540)
- f) Two days after plating. Diffuse intracellular staining of ER pattern for laminin. (×540)
- g) Four days after plating. Paranuclear staining of Golgi pattern for laminin. (×540)
- h) Nine days after plating. Extracellular deposition of laminin is found in coarse granular or thick thread-like fashion. (×540)
- i) One day after plating. Fine and diffuse intracellular staining of ER pattern for heparan sulfate proteoglycan (×540)
- j) Five days after plating. Golgi pattern staining for heparan sulfate proteoglycan. (×540)
- k) Nine days after plating. Thread-like network of immunofluorescence for heparan sulfate proteoglycan in extracellular space. (×540)
- l) One day after plating. Intracellular ER pattern staining for entactin. (×540)
- m) Two days after plating. Paranuclear staining of Golgi pattern for entactin is found only in a small number of cells. (×540)
- n) Seven days after plating. Extracellular deposition of entactin. (×540)
- o) Two days after plating. Intracellular ER pattern staining for fibronectin. (×540)
- p) Seven days after plating. After extracellular deposition appears. Both Golgi and ER pattern stainings for fibronectin are found in a small number of cells. (×540)
- q) Eight days after plating. Network of extracellular aggregation of immunofluorescence for fibronectin. (×540)

Fig. 17 Schematic time course of biosynthesis and secretion of basement membrane proteins by ACC cells: determination based on immunofluorescence patterns.

で内面をおおわれていることに、われわれは以前より、注目していた¹²⁾。

本研究の以前に、Toida らは腺様嚢胞癌の偽嚢胞腔内に基底膜物質IV型コラーゲン、ラミニンとファイブロンネクチンが存在することを免疫組織化学的に証明していた^{31,32)}。さらに、Caselitz ら³³⁾や Azumi & Battifora³⁴⁾ も同様の報告をしている。しかし、かれらは、それらの報告で、抗体をもちいて、偽嚢胞内に個々の基底膜分子を証明はしたものの、偽嚢胞以外の腺様嚢胞癌組織内に基底膜物質がどのように分布し、この腫瘍の組織構築にいかなる影響をおよぼしているのか、また、それらの基底膜分子の由来についての問題意識はもっていなかった。

今回の研究で、著者は、四種類の基底膜分子の腺様嚢胞癌組織内における免疫組織学的局在を、はじめて、広範囲に比較検討した。基底膜分子は、ひとり偽嚢胞内にかぎらず、ひろく腫瘍間質に蓄積されており、しかも、腺様嚢胞癌細胞がみずからこの四種類の基底膜タンパク質を産生することをみいだした。基底膜産生はこの腫瘍の基本的性

格であり、このことが基底膜の豊富な組織にこのんで浸潤したり、経過がゆるやかであるなどの特異な臨床像を規定している可能性をしめした。

<偽嚢胞と腫瘍間質>

再度、電子顕微鏡的所見について言及すると、偽嚢胞は多層の基底膜様構造で裏うちされ、嚢胞腔には均質無構造な物質、微細な線維状、あるいは、星状の顆粒性物質をいれており、まれに膠原線維の断片が観察される⁷⁻¹²⁾。今回の免疫組織化学的染色では、基底膜分子の陽性反応が偽嚢胞辺縁部だけでなく、腔内にびまん性であったが、このことは、電子顕微鏡的に認められる基底膜にのみこまれていないフリーな状態の分子が嚢胞内に多数存在していることをしめしている。嚢胞腔には、間質細胞がほとんどみられないので、これらの基底膜分子は偽嚢胞周囲の腫瘍細胞によって産生されるのではないかと、免疫染色の結果をえた時点で、予想された。

基底膜タンパク質は、偽嚢胞以外の間質にも存在していた。硝子様間質は、電子顕微鏡的には均質無構造または微細線維状で¹¹⁾、免疫組織化学的

反応様式は嚢胞腔内と近似し、基底膜物質を主体にした細胞外基質の沈着とおもわれる。これに対して、疎性結合組織性の間質は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが主体で、このプロテオグリカンはほかの基底膜分子とことなる生合成の機序を持つ可能性を示唆している。岡田らは巨大分子量で、密度勾配遠心で低密度のヘパラン硫酸糖鎖を有するプロテオグリカンが培養間葉系細胞によって合成されたことを報告している³⁵⁾。興味あることに、そのプロテオグリカンは、成熟ラット間質にはみられず、胎児の間質だけにみだされている。

基底膜の免疫染色をおこなうと、偽嚢胞腔と外側の硝子様間質とが連続していることが明瞭に観察された。この結果から、偽嚢胞の形成過程はつぎのようにかんがえられる。1) 腫瘍細胞の細胞巣では、個々の細胞が基底膜に接して配列し、2) 細胞が索状にのびて多方向に生長するにしたがい、細胞はたがいに融合しあって複雑に陥入した間質を形成し、3) 陥入した間質は、外側の間質から隔離され、4) 隔離された間質、すなわち、偽嚢胞は腫瘍細胞の分泌する基底膜物質を主体とした細胞外基質の貯留によって拡張する。唐草模様の間質は偽嚢胞の逆の表現形である。5) もうひとつの偽嚢胞形成の経路として、島嶼状の細胞巣では、腫瘍細胞が細胞内の細胞間隙に細胞外基質を分泌し、偽嚢胞となる間質をつくる。

ここで、注目すべきは、どのような組織型の腺様嚢胞癌でも、腫瘍細胞が基底膜分子陽性の間質に接しうるように配列していることである。唯一の例外は、solid type with necrosis の組織型であるが、しかし、この型の腫瘍細胞にさえも、米粒状基底膜陽性の間質が散在しており、後述するように、腺癌との鑑別診断を可能にしている。この組織型では、基底膜物質の沈着と腫瘍細胞増殖の速度が他組織型とことなり、細胞の中心部に凝固壊死をおこすことが推測される。これらの結果より、腺様嚢胞癌細胞の増殖には、基本的に基底膜が必要であることが示唆された。

<腺様嚢胞癌の基底膜親和性>

基底膜の豊富な末梢神経、血管壁、骨格筋組織への腺様嚢胞癌細胞の侵襲は、免疫染色によって、より明瞭に観察された。腺様嚢胞癌の神経侵襲は、

従来の教科書では、神経周囲のリンパ管への浸潤によると説明されていた^{36,37)}。しかし、この解釈では、この腫瘍のリンパ行性転移が比較的すくなく、長期間をへて、末梢神経にそった中枢神経系への転移が頻繁である事実^{6,13,38-42)}を、説明できない。H. E. 染色標本では、神経周囲のリンパ管腔の同定は困難であるが、今回の基底膜免疫染色によって、腫瘍細胞がリンパ管ではなくて、神経内膜、神経周膜を侵襲しているのがあきらかにできた。著者はこの所見を腺様嚢胞癌細胞が基底膜の豊富な末梢神経に親和性をもつためと解釈している。同様に、骨格筋、血管侵襲の頻繁なこと、さらに血行性転移をおこしやすい傾向^{6,14)}は、この腫瘍の基底膜親和性で説明できそうである。

腺様嚢胞癌の基底膜親和性という性格は、この腫瘍の組織構造にのみならず、その生物学的性格にも反映している。唾液腺の腺様嚢胞癌は腺癌より予後がよいため、低悪性度あるいは中悪性度の腫瘍とみなされている^{6,14,41-43)}。しかし、solid type with necrosis の組織型は例外で、予後は不良である^{6,14,44,45)}。これは、前述のとおり、この型の腺様嚢胞癌細胞が十分に基底膜と接着するという性格をうしなったためかもしれない。

<腺様嚢胞癌細胞の基底膜産生>

腺様嚢胞癌の特異な組織構築と臨床像とが腫瘍細胞の基底膜好性で説明されそうであるとなれば、その基底膜が癌細胞自身から産生されるのかどうかに興味がもたれる。

Barsky らは、ELISA 法と SDS アクリルアミド電気泳動法をもちいて、ヌードマウスの腺様嚢胞癌と卵黄嚢腫移植腫瘍組織から、ラミニンとIV型コラーゲンを証明して、各腫瘍組織内で、基底膜物質が産生されていることを報告している⁴⁶⁾。Sobue らは、われわれの ACC2, ACC3 類似の腺様嚢胞癌の株細胞を樹立し、基底膜物質陽性の細胞外基質を免疫組織化学的にしめした⁴⁷⁾。しかし、これらの実験は、腫瘍細胞自身による基底膜合成を直接的に証明してはいなかった。

今回の、ヒトの唾液腺腺様嚢胞癌由来の株細胞 ACC2, ACC3 をもちいた実験では、蛍光抗体法によって、腺様嚢胞癌細胞による基底膜分子の細胞内生合成、細胞外分泌の過程を詳細に追跡しえ

た。ヌードマウス移植実験では、ACC2, ACC3 細胞は、偽嚢胞形成能を保持していることが証明された。経時的な観察の結果、ACC2, ACC3 細胞は、いずれも、四種類の基底膜タンパク質、IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンとファイブロネクチンを生合成することの直接的な証拠がえられた。その生合成は、細胞内の小胞体パターン、ゴルジパターンで確認されたし、細胞外沈着からは、ACC2, ACC3 細胞による、これらの物質の分泌が証明された。すなわち、腺様嚢胞癌の特徴的な間質の大部分は、腫瘍実質細胞によって形成されるといえるだろう。

小胞体ないしゴルジ装置での局在を確定するには、免疫電顕的証明が必要であることはいうをまたない。Ishimura らはラット腎メサンジウム細胞を培養して、光顕レベルで細胞外基質の小胞体パターン、ゴルジパターの免疫染色の結果をえて、これらを、電顕的に追認しているので⁴⁸⁾、著者は、今回の実験結果の細胞内局在の解釈に無理があるとはかんがえていない。

腺様嚢胞癌の間質には、炎症性細胞の反応がとばしいことにも、われわれは注目してきたが、この組織学的特徴と、実質細胞による活発な間質形成とのあいだにはなんらかの関係があるかもしれない。また、ACC2, ACC3 細胞では、ゴルジパターンや細胞外沈着の出現時期がタンパク質によってことになっており、それぞれのタンパク質の生合成と分泌が独立した相を有することを示唆している。しかし、それらの「ずれ」の制御がどのような意義をもつかは、今後解明すべき課題である。

今回もちいた ACC2, ACC3 の細胞系は、ヒトの基底膜タンパク質産生細胞としてきわめて貴重であり、今後、細胞外基質の実験モデルとして、基底膜構造の解明などにひろく利用されうだろう。また、ヒトの基底膜タンパク質の供給源としても重要なものであることを特記したい。

<基底膜分泌と細胞増殖>

基底膜は、前述のとおり、それに付着した上皮細胞の形態、生長、分化に影響をおよぼすことが知られている⁴⁹⁾。

今回の実験では、まず、ACC2, ACC3 細胞

は、ファイブロネクチンでコーティングしたフラスコ上で、きわめてよく伸展することが観察されたが、最近、Ingber は、毛細血管内皮細胞で、細胞形態と増殖の関係に関してコンピュータ画像解析によって興味ある報告をしている⁵⁰⁾。すなわち、細胞投射面積は接触ファイブロネクチン濃度と DNA 合成量とに正比例するというもので、細胞外基質によって伸展した細胞の細胞増殖活性がたかいという結果は興味ぶかい。

細胞が伸展するには、これにさきだって、細胞が基質に付着することが重要な条件であるとされているが⁵¹⁻⁵³⁾、今回は、細胞の接着に関する実験はおこなっていない。しかし、細胞膜上の細胞外基質受容体には、インテグリンファミリーをはじめ、あらたに発見されるものも多く⁵⁴⁾、ACC2, ACC3 細胞は、この方面の好研究材料として、注目されよう。

細胞増殖度測定の結果から、ACC2, ACC3 細胞の増殖は、ファイブロネクチンによるコーティングによって、おおきく変化することがしめされた。増殖曲線の多相性からは、コーティングにもちいられたファイブロネクチン以外の、細胞自身から産生分泌される基底膜分子やファイブロネクチンなどの細胞外基質の影響が示唆された。すなわち、この腫瘍細胞には、自己が分泌する細胞外基質によって自己の増殖が制御されるという autocrine 機構が存在するとかんがえられる。同様の観察を、Ishimura らが培養ラット腎メサンジウム細胞についておこなっている⁴⁸⁾。かれらは、免疫細胞化学的に、この細胞が、III型、およびIV型コラーゲン、ラミニンとファイブロネクチンを生合成し、この細胞自身産生したIV型コラーゲン、ラミニンの細胞外沈着が、そのほかの細胞外基質の生合成を促進させ、また、細胞自身の増殖にも影響することをしめた。上皮系細胞については、Madaara らが、間質型コラーゲンによって、ヒトの培養腸上皮細胞の伸展、集密化がうながされるという報告をしている⁵⁵⁾。

今回の実験結果から、ACC2, ACC3 細胞では、基底膜分子種によって、細胞内生合成と細胞外沈着の多少と時間的ずれがあることがうかがわれた。さまざまな種類の細胞が、培養の環境によ

って、細胞外基質の産生のパターンを変化させるようであることは、前述の autocrine 機構を証明するものである。ヒトの神経膠腫由来細胞培養産物を分析した McKeever らによれば、同一腫瘍由来でも、細胞系によって、ラミニン、IV型コラーゲン、還元銀陽性コラーゲンの生合成量がことなるといふ⁵⁶⁾。Rutka らは、ヒト悪性神経膠腫由来細胞をラミニンとファイブロンネクチンでコーティングした容器で培養すると、細胞がよく増殖し、敷石状に集密化するのに、正常軟膜の細胞外基質、すなわち、I型およびIV型コラーゲンでコーティングした場合、細胞の増殖が低下し、分化が誘導されて星状の形態を呈し、異型性がたかまり、GFAPの産生が、無コーティングより、増加するという、細胞外基質による腫瘍細胞分化制御の現象を報告している⁵⁷⁾。また、Erkell らは、マウスの転移性リンパ腫細胞が、非転移性のリンパ腫細胞より、基底膜物質を含むゲルに浸入しやすいという、細胞側の事情によって細胞外基質との親和性に相違が生じることをみいだした⁵⁸⁾。

以上のとおり、細胞外基質の分泌が、上皮系および非上皮系腫瘍細胞の増殖、分化、転移などに、重要な現象であろうことはまちがいないが、細胞一般に通用する原則をみいだすまえに、個々の種類の細胞によってことなる現象のさらに詳細な観察が必要であろう。

<鑑別診断>

腺様嚢胞癌の基底膜免疫染色パターンが複雑な様相を呈するのに対し、腺癌のそれは腫瘍胞巣周囲においてのみ陽性という、きわめて単純なものであった。したがって、H. E. 染色標本上では鑑別の困難な組織型の腺様嚢胞癌と腺癌の診断に、この免疫染色は有用であることが判明した。たとえば、篩状構造の不明瞭な solid type 腺様嚢胞癌と solid type 腺癌の鑑別、小嚢嚢胞を有する tubular type 腺様嚢胞癌と tubular type 腺癌の鑑別など

である。前者の場合、基底膜免疫染色で、充実性胞巣内に斑状の陽性所見があれば、腺様嚢胞癌と診断される。後者の場合、管腔様構造の腔内が陽性であれば、腺様嚢胞癌が診断される。腺様嚢胞癌の外科手術では、より広範囲な切除がおこなわれるので、この鑑別診断の確立は臨床的に重要な意味をもつ。

<ヒアルロニダーゼ処理>

組織切片上での基底膜の免疫染色には、切片をヒアルロニダーゼで前処理するのが必須である。酵素処理による染色性の向上は、基底膜各分子とヒアルロン酸の結合のあることを意味する。臓器、組織部位による基底膜の異種性が報告されているが⁵⁹⁻⁶¹⁾、各組織で各抗体に対する酵素消化感度が相違するという今回の結果は、組織部位によって、四種類の基底膜分子とヒアルロン酸との結合様式に特異性があることをしめしている。胎児組織で報告されているように^{21,62,63)}、ヒアルロニダーゼ処理が細胞外基質タンパク質の免疫組織化学的染色の基本的な手順とかがえられる。

謝辞：本研究をおこなうにあたって終始御懇篤なるご指導と本論文のご校閲を賜りました岡邊治男教授に心より感謝致します。

本研究の計画と実施には、新潟大学歯学部の中 敬教授に直接のご指導をいただきました。また、上海第二医科大学口腔医学院の劉 瓊如教授より外科材料、同医学院の邱 蔚六教授と何 榮根教授より株細胞を提供していただき、長崎大学歯学部の坂井英昭博士、柴田恭明学士には、各種タンパク質の精製と抗体作製でご援助をうけました。実験をすすめるにあたっては、長崎大学歯学部口腔病理学教室員各位のご助言とご協力をいただきました。ここに、あつく御礼を申しあげます。

本論文の要旨は、第77回および第79回日本病理学会総会（1988年6月札幌、1990年3月福岡）と第5回国際口腔病理学会（1990年7月東京）において発表した。

抄録：腺様嚢胞癌の外科摘出材料をもちいて、腫瘍組織内の四種類の基底膜タンパク質：IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンの局在を免疫組織化学的に検討した。基底膜タンパク質は腺様嚢胞癌に特徴的な嚢嚢腔はじめ、ひろく腫瘍間質に蓄積していた。また、この腫瘍特有の神経、筋肉、血管侵襲は腫瘍細胞の基底膜親和性によって説明できることが示唆された。そこで、ヒト唾液腺腺様嚢胞癌由来の株細胞 ACC2, ACC3 を用いて、試験管内で基底膜タンパク質およびファイブロンネクチンの生合

成を蛍光抗体法で追跡したところ、継代後、細胞が接着、伸展、増殖するのにともなう、細胞内の小胞体や、ゴルジ装置での局在を示唆する所見や、細胞外沈着がみとめられた。すなわち、腺様嚢胞癌実質細胞は四種類の基底膜分子とファイブロンクチンを産生し、細胞外に分泌することが証明された。したがって、基底膜生合成能が本腫瘍の組織構築と生物学的性格に反映されているとかがえられた。

文 献

- 1) Hübner, G., Kleinsasser, O. und Klein, H.: Zur Feinstruktur und Genese der Cylindrome der Speicheldrüsen. Virchows Arch. [Pathol. Anat.] **347**: 296-315, 1969.
- 2) Thackray, A. C. and Lucas, R. B.: Tumor of the major salivary glands. The Armed Forces Institute of Pathology, Washington D. C., pp. 91-99, 1974.
- 3) Busuttill, A.: Adenoid cystic carcinoma of the minor salivary glands. J. Laryngol. Otol. **91**: 41-53, 1977.
- 4) Nochomovitz, L. E. and Kahn L. B.: Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland and its histologic variants. Oral Surg. **44**: 394-404, 1977.
- 5) Saku, T., Okabe, H., Yagi, Y., Sato, E. and Tsuda, N.: A comparative study on the immunolocalization of keratin and myosin in salivary gland tumors. Acta Pathol. Jpn. **34**: 1031-1040, 1984.
- 6) Cheng, J., Liu, A. R. and Liu, Z.: A clinicopathological study of 225 cases of adenoid cystic carcinoma of salivary glands. Chin. J. Stomatol. **20**: 15-18, 1985.
- 7) Hoshino, M. and Yamamoto, I.: Ultrastructure of adenoid cystic carcinoma. Cancer **25**: 186-198, 1970.
- 8) Tandler, B.: Ultrastructure of adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. Lab. Invest. **24**: 504-512, 1971.
- 9) Chisholm, D. M., Waterhouse, J. P., Kraucunas, E. and Sciubba, J. J.: A qualitative and quantitative electron microscopic study of the structure of the adenoid cystic carcinoma of human minor salivary glands. J. Oral Pathol. **4**: 103-119, 1975.
- 10) Chen, S. Y.: Adenoid cystic carcinoma of minor salivary gland. Histochemical and electron microscopic studies of cystlike spaces. Oral Surg. **42**: 606-619, 1976.
- 11) Osborn, D. A.: Morphology and the natural history of cribriform adenocarcinoma (adenoid cystic carcinoma). J. Clin. Pathol. **30**: 195-205, 1977.
- 12) Cheng, J., Liu, A. R. and Liu, Z.: Electron microscopic and histochemical study of adenoid cystic carcinoma of salivary gland. Chin. J. Stomatol. **20**: 135-137, 1985.
- 13) Tarpley, T. M. Jr. and Giansanti, J. S.: Adenoid cystic carcinoma. Analysis of fifty oral cases. Oral Surg. **41**: 484-497, 1976.
- 14) Perzin, K. H., Gullane, P. and Clairmont, A. C.: Adenoid cystic carcinoma arising in salivary glands: A correlation of histologic features and clinic course. Cancer **42**: 265-282, 1978.
- 15) Thackray, A. C.: Histological typing of salivary gland tumours. World Health Organization Geneva, pp. 24-25, 1972.
- 16) Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R., Risteli, J., Dieringer, H., Voss, T. and Glanville, R. W.: Macromolecular structure of basement membrane collagens. Identification of 7S collagen as a cross-linking domain of type IV collagen. FEBS Lett. **125**: 123-128, 1981.
- 17) Risteli, L. and Timpl, R.: Isolation and characterization of pepsin fragments of laminin from human placental and renal basement membranes. Biochem. J. **193**: 749-755, 1981.
- 18) Saku, T. and Furthmayr, H.: Characterization of the major heparan sulfate proteoglycan secreted by bovine aortic endothelial cells in culture: Homology to the large molecular weight molecule of basement membrane. J. Biol. Chem. **265**: 3514-3523, 1989.
- 19) Lwebuga-Mukasa, J. S., Saku, T., Foellmer, H. G. and Madri, J. A.: Adult rat type II pneumocytes secrete extracellular matrix components which regulate cell function. J. Cell Physiol. (in press)
- 20) Furthmayr, H.: Immunization procedures, isolation by affinity chromatography, and serological and immunochemical characterization of collagen specific antibodies, immunochemistry of the Extracellular Matrix. Volume I. (Edited by H. Furthmayr) CRC Press, Boca Raton, pp. 143-178, 1981.
- 21) Sternberger, L. A., Hardy, P. H. Jr., Cuculis, J. J. and Meyer, H. G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horse-radish peroxidase-antihorse-radish peroxidase)

- and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18** : 315-333, 1970.
- 22) Leivo, I., Vaheri, A., Timpl, R. and Wartiovaara, J. : Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Develop. Biol.* **76** : 100-114, 1980.
 - 23) He, R. G., Zhang, X. S., Zhou, X. J., Wang, Z., Zhang, X. L., Qiu, W. L., Han, Y. S. and Zhang, R. X. : The establishment of cell lines of adenoid cystic carcinoma of human salivary glands (ACC-2, ACC-3) and a study of morphology. *West Chin. J. Stomatol.* **6** : 1-4, 1988.
 - 24) Katsuta, H., Takaoka, T., Oishi, Y., Baba, T. and Chang, K. C. : Cultivation of fibroblasts from chick embryo heart in the simplified replicate tissue culture. *Jpn. J. Exp. Med.* **24** : 125-139, 1954.
 - 25) Engvall, E. and Ruoslahti, E. : Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer* **20** : 1-5, 1977.
 - 26) Kefalides, N. A. : Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* **6** : 63-104, 1973.
 - 27) Timpl, R., Rohde, H., Gehron-Robey, P., Rennard, S. I., Foidart, J. M. and Martin, G. R. : Laminin—A glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* **254** : 9933-9937, 1979.
 - 28) Kanwar, Y. and Farquhar, M. C. : Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from glomerular basement membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76** : 4493-4497, 1979.
 - 29) Carlin, B., Jaffe, R., Bender, B. and Chung, A. E. : Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **256** : 5209-5214, 1981.
 - 30) Mazur, M. T. and Battifora, H. A. : Adenoid cystic carcinoma of the uterine cervix : Ultrastructure, immunofluorescence, and criteria for diagnosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **77** : 494-500, 1982.
 - 31) Toida, M., Takeuchi, J., Hara, K., Sobue, M., Tsukidate, K., Goto, K. and Nakashima, N. : Histochemical studies of intercellular components of salivary gland tumors with special reference to glycosaminoglycan, laminin and vascular elements. *Virchows Arch. [Pathol. Anat.]* **403** : 15-26, 1984.
 - 32) Toida, M., Takeuchi, J., Sobue, M., Tsukidate, K., Akao, S., Fukatsu, T. and Nakashima, N. : Histochemical studies on pseudocysts in adenoid cystic carcinoma of the human salivary gland. *Histochem. J.* **17** : 913-924, 1985.
 - 33) Caselitz, J., Schulze, I. and Seifert, G. : Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands : an immunohistochemical study. *J. Oral Pathol.* **15** : 308-318, 1986.
 - 34) Azumi, N. and Battifora, H. : The cellular composition of adenoid cystic carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* **60** : 1589-1598, 1987.
 - 35) 岡田貴子, 加藤正人, 鈴木 旺, 木全弘治 : 基底膜成分, 低密度ヘパラン硫酸プロテオグリカンの間充織による合成. 第41回日本細胞生物学会大会講演要旨集 pp. 89, 1988.
 - 36) Bhaskar, S. N. : *Synopsis of Oral Pathology*, Fifth Edition. The C. V. Mosby Company, St. Louis, pp. 578, 1977.
 - 37) Anderson, W. A. D. and Kissane, J. M. : *Pathology*, Seventh Edition. The C. V. Mosby Company, St. Louis. pp. 1276, 1977.
 - 38) Foote, F. W. Jr. and Frazell, E. L. : Tumors of the major and minor salivary glands. *Cancer* **6** : 1065-1133, 1953.
 - 39) Leafstedt, S. W., Gaeta, J. F., Sako, T., Marchetta, F. C. and Shedd, D. P. : Adenoid cystic carcinoma of major and minor salivary glands. *Am. J. Surg.* **122** : 756-762, 1971.
 - 40) Conley, J., Myers, E. and Cole, R. : Analysis of 115 patients with tumors of the submandibular gland. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **80** : 323-330, 1972.
 - 41) Seaver, P. R. and Kuhn, P. G. : Adenoid cystic carcinoma of salivary glands : A study of ninety-three cases. *Am. J. Surg.* **137** : 449-455, 1979.
 - 42) Spiro, R. H., Huvos, A. G. and Strong, E. W. : Adenoid cystic carcinoma : Factors influencing survival. *Am. J. Surg.* **138** : 579-583, 1979.
 - 43) Man, D. and McInnes, G. : Adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. *Delaware Med. J.* **52** : 423-425, 1980.
 - 44) Marsh, W. L. and Allen, M. S. : Adenoid cystic carcinoma : Biologic behavior in 38 patients. *Cancer* **43** : 1463-1473, 1979.
 - 45) Szanto, P. A., Luna, M. A., Tortoledo, M. E. and White, R. A. : Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer* **54** : 1062-1069, 1984.
 - 46) Barsky, S. H., Layfield, L., Varki, N. and Bhuta, S. : Two human tumors with high basement membrane-producing potential. *Cancer* **61** : 1798-1806, 1988.
 - 47) Sobue, M., Takeuchi, J., Niwa, M., Yasui, C., Nakagaki, S., Nagasaka, T., Fukatsu, T., Saga, S. and Nakashima, N. : Establishment of a cell line producing basement

- membrane components from an adenoid cystic carcinoma of the humans alivary gland. *Virchows Arch. [Cell Pahol.]* **57** : 203-208, 1989.
- 48) Ishimura, E., Sterzel, R. B., Budde, K. and Kashgarian, M.: Formation of extracellular matrix by cultured rat mesangial cells. *Am. J. Pathol.* **134** : 843-855, 1989.
 - 49) Timpl, R. and Dziadek, M.: Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **180** : 487-502, 1989.
 - 50) Ingber, D. E.: Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Cell Biol.* **87** : 3579-3583, 1990.
 - 51) Campbell, J. H. and Terranova, V. P.: Laminin: molecular organization and biological function. *J. Oral Pathol.* **17** : 309-323, 1988.
 - 52) Aumailley, M. and Timpl, R.: Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. *J. Cell Biol.* **103** : 1569-1575, 1986.
 - 53) Tomaselli, K. J., Damsky, C. H. and Reichardt, L. F.: Interactions of a neuronal cell line (PC12) with laminin, collagen IV, and fibronectin: Identification of integrin-related glycoproteins involved in attachment and process outgrowth. *J. Cell Biol.* **105** : 2347-2358, 1987.
 - 54) Hynes, R. O.: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48** : 549-554, 1987.
 - 55) Madara, J. L., Stafford, J., Dharmasathaphorn, K. and Carlson, S.: Structural analysis of a human intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* **92** : 1133-1145, 1987.
 - 56) McKeever, P. E., Fligiel, S. E. G., Varani, J., Castle, R. L. and Hood, T. W.: Products of cells cultured from gliomas VII. Extracellular matrix proteins of gliomas which contain glial fibrillary acidic protein. *Lab. Invest.* **60** : 286-295, 1989.
 - 57) Rutka, J. T., Giblin, J. R., Apodaca, G., DeArmond, S. J., Stern, R. and Rosenblum, M. L.: Inhibition of growth and differentiation in a malignant human glioma cell line by normal leptomeningeal extracellular matrix proteins. *Cancer Res.* **47** : 3515-3522, 1987.
 - 58) Erkell, L. J. and Schirmacher, V.: Quantitative *in vitro* assay for tumor cell invasion through extracellular matrix or into protein gels. *Cancer Res.* **48** : 6933-6937, 1988.
 - 59) Martinez-Hernandez, A. and Amenta, P. S.: The basement membrane in pathology. *Lab. Invest.* **48** : 656-677, 1983.
 - 60) Kefalides, N. A., Howard, P. and Ohno, N.: Heterogeneity in basement membranes determines their structure and function, *Basement Membrane*. (Edited by Shibata S.) Elsevier Science Publishers B. V, Amsterdam, pp 73-87, 1985.
 - 61) Couchman, J. R.: Heterogeneous distribution of a basement membrane heparan sulfate proteoglycan in rat tissues. *J. Cell Biol.* **105** : 1901-1916, 1987.
 - 62) von der Mark, H., von der Mark, K. and Gay, S.: Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. I. Preparation of collagen type I and II specific antibodies and their application to early stages of the chick embryo. *Develop. Biol.* **48** : 237-249, 1976.
 - 63) Vertel, B. M. and Dorfman, A.: An immunohistochemical study of extracellular matrix formation during chondrogenesis. *Develop. Biol.* **62** : 1-12, 1978.