口腔粘膜扁平上皮癌再発症例における メタロチオネインの免疫組織化学的検討

伊藤道一郎 宮崎力 上谷猛
馬場信行 空閑祥浩 水野明夫

要旨：メタロチオネイン（MT）は低分子量（6000-7500）の金属結合蛋白で、最近、腫瘍などの細胞増殖との関連についての重要な知見が得られている。今回、口腔粘膜扁平上皮癌再発症例（n=12）において、MT発現について免疫組織化学的に検討した。ホルマリン固定・パラフィン包埋標本を抗MT抗体を用いた avidin-biotin peroxidase complex method により染色し、陽性率を算出した。扁平上皮癌非再発症例（n=21）および再発症例（n=12）の初発時の MT 陽性率はそれぞれ40.8%、70.1%で、両者間に統計学的有意差が認められた。また、再発症例の初発時および再発時の MT 陽性率は、それぞれ、70.1%および76.7%で、両者間に統計学的有意差は認められなかった。しかしながら、再発症例（n=9）を症例別にみると、再発時の MT 陽性率が増加傾向を示した6例は、すべてが腫瘍死であったのに対し、MT 陽性率が減少傾向を示した3例は、すべてが予後良好であった。したがって、免疫組織化学的な MT 陽性率の検索は、口腔粘膜扁平上皮癌症例における腫瘍細胞の性質を把握する上で意義があり、臨床的には治療法の選択、患者の予後予測の一指標として有用と考えられた。

キーワード：メタロチオネイン、扁平上皮癌、再発

緒 言

ヒトをはじめ哺乳類や種々の動植物にもその存在が広く認められているメタロチオネイン（MT）は、金属解毒蛋白として注目されてきた^{1,2)}。しかし、最近、胚発生過程の増殖期細胞、胎児・新生児の増殖細胞、再生肝細胞および癌細胞などで MT の発現が認められ³⁻¹³⁾、さらに、実験培養癌細胞においても MT が誘導されることが報告されている¹⁴⁾ ことから、増殖力旺盛な細胞および悪性腫瘍細胞の特性から MT が細胞増殖に関与している可能性が推測される。また、抗癌剤に対する副作用軽減効果や抗腫瘍効果の減弱作用の点から癌治療の立場からも注目される^{19-31,38)}。したがって、免疫組織化学的染色による MT 発現量の検討は、腫瘍細胞の特性を知る上で腫瘍マーカーに類する意義を有するものと考えられる。ところが MT 発現

に関して、臨床例での検討報告は少なく、口腔癌、ことに扁平上皮癌との関連性についての報告はない。

そこで、このたび、口腔粘膜扁平上皮癌再発症例における MT 発現について免疫組織化学的検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

対象および方法

対象症例は、1990～1995年の6年間に本学歯学部附属病院第一口腔外科を受診し、同院検査室（口腔病理学教室）で病理組織学的に扁平上皮癌と診断された89症例の中で、当科で加療し、初回治療後1年以上経過観察可能であった再発症例12例を対象とした。その内訳は、男性10例、女性2例、平均年齢は61歳であった。UICCの臨床病期分類（1987年）はⅠ期2例、Ⅱ期5例、Ⅲ期1例、Ⅳ期4例、1997年のWHO分類による組織学的分類⁴⁰⁾

長崎大学歯学部第一口腔外科学教室（主任：水野明夫教授）
〔1998年1月14日受付，1998年8月24日受理〕

表1 再発症例の臨床・病理学的事項および免疫組織化学的所見

症例	年齢 性	発現 部位	病期 分類	分化度	初発時 浸潤度	MT 陽性率	治療内容	再発時 分化度	再発時 浸潤度	MT 陽性率	経過
1	47M	舌	I	M	3	79.6	化 (PEP30mg) + 手 + 放 (40Gy)	M	4 D	88.4	5 年後に再発し、 6 か月目に腫瘍死
2	67F	舌・ 頬粘膜	I	W	4 D	85.1	化 (PEP30mg) + 手	W	4 C	82.4	8 か月後に再発し、 3 年 5 か月良好
3	48M		舌	II	W	2	42.5	化 (UFT600mg/ 日) + 手 + 放 (50Gy)	M	4 C	86.8
4	61M	舌・ 口底	II	W	2	38.2	化 (UFT600mg/ 日) + 手 + 放 (40Gy)	M	3	79.6	2 年 2 か月後に再発し、 1 年目に腫瘍死
5	79M	口底	II	W	3	67.2	化 (PEP25mg) + 手 + 放 (40Gy)	W	3	42.5	9 か月後に再発し、 4 年良好
6	64M	口蓋	II	M	3	72.8	化 (UFT600mg/ 日 + PFP 30mg) + 手 + 放 (40Gy)	W	3	46.3	1 年 2 か月後に再発し、 5 年 3 か月良好
7	50M	舌	II	W	4 C	78.2	化 (UFT600mg/ 日) + 手 + 放 (40Gy)	M	4 C	88.2	6 か月後に再発し、 4 か月目に腫瘍死
8	59M	口蓋	III	W	3	61.6	化 (PEP30mg) + 手 + 放 (40Gy)	M	4 C	88.5	7 か月後に再発し、 3 か月目に腫瘍死
9	82F	下顎歯肉	IV	M	3	46.3	化 (UTF300mg/ 日) + 手	M	4 C	87.8	3 年 2 か月後に再発し、 6 か月目に腫瘍死
10	70M	舌	IV	M	4 C	86.0	化 (PEP25mg) + 放 (30Gy) + 手		?		8 か月後に再発し、 2 か月目に腫瘍死
11	49M	上顎歯肉	IV	M	4 C	94.0	化 (CDDP100mg) + 手		?		7 か月後に再発し、 8 か月良好
12	60M	口蓋	IV	M	4 C	88.6	化 (UFT600mg) + 手		?		5 か月後に再発し、 3 か月目に腫瘍死
平均 61.3 歳 平均± S.D. : 70.1 ± 19.0% 平均± S.D. : 76.7±18.6% 生存 : 4 (化 : 化学療法, 手 : 手術, 放 : 放射線療法) 腫瘍死 : 8											

は高分化型(W)が6例, 中等度分化型(M)6例, および, 山本・小浜分類による浸潤様式は2型2例, 3型5例, 4C型4例, 4D型1例であった。なお, 再発症例12例のうち, 再発時検討できなかった3例を除いた9例の組織学的分類は高分化型(W)3例, 中等度分化型(M)6例, また, 山本・小浜分類による浸潤様式は2型0例, 3型3例, 4C型5例, 4D型1例であった。対象症例の原発部治療法は, 化学療法単独が0例, 化学療法と手術療法の併用が4例, 化学療法と手術療法と放射線療法の併用が8例であった(表1)。化学療法におけるUFTの投与は術前1~2週間, 術後約1年間の内服を行い, PEPの投与はすべて持続皮下注を施行した。腫瘍切除に際しては, 腫瘍硬結辺縁より1.5~2cmの安全域をとり切除した。放射線療法は術後照射で外照射30~50Gyを行った。

初診時の生検組織(12例)と再発時の生検組織および手術で得られた組織(9例)を10%ホルマリン固定(48時間)の後, パラフィン包埋標本作製した。なお, ホルマリン固定による抗原性への影響は問題ないとされる¹³⁾が, 保存期間による影響を避けるために標本作成後5年以内のものをを用いた。抗MTモノクローナル抗体はDAKO社MT-E9を用い, 通法にしたがいABC法により免疫組織化学的染色を行った(表2)。

本研究では, 核内または, 核および細胞質の両者にび慢性または顆粒状反応物として陽性所見が認められるものを陽性細胞とし, 無作意に腫瘍細胞2500~3000個を観察し, その中のMT抗体陽性細胞数を計数し, MT陽性率を算出した(表1)。また, 対照群として正常口腔粘膜10症例を正常口腔粘膜群, 口腔扁平上皮癌89症例中5年以上再

表2 ABC法によるMetallothioneinの染色

- ①脱パラフィン
- ②0.3% H_2O_2 加メタノール, 20分
- ③トリプシン処理, 37℃, 15分
- ④5%正常血清, 室温, 20分
- ⑤1次抗体 (DAKO社-MT, E9), 室温, 60分
- ⑥洗浄, PBS
- ⑦2次抗体 (ビオチン化2次抗体), 室温20分
- ⑧洗浄, PBS
- ⑨ABCcomplex, 室温, 20分
- ⑩洗浄, PBS
- ⑪DAB反応, 室温, 5分
- ⑫洗浄, 水洗
- ⑬メチルグリーン染色, 10分
- ⑭脱水, 透徹, 封入

表3 正常口腔粘膜群, 非再発症例群および再発症例群におけるMTおよびPCNA陽性率

	MT陽性率(%)	PCNA陽性率(%)
正常口腔粘膜群 (n=10)	38.0±6.9	15.2±2.4
非再発症例群 (n=21)	40.8±21.4	32.5±10.3
再発症例群		
初発時 (n=12)	70.1±19.0	54.6±16.5
再発時 (n=9)	76.8±18.6	58.2±15.2

発が認められなかった症例の中から無作為に選んだ21症例を非再発症例群とした。正常口腔組織は、生検および手術で得られた組織のHE染色標本上で明らかに正常な上皮細胞層と判断した部位を用い、基底層から角質層の核を有する細胞を観察し、陽性細胞を計数しMT陽性率を算出した。免疫組織化学的染色の陽性対照には、MT染色陽性として知られるラット小腸のパネート細胞を用いた¹³⁾。また、抗原とMT抗体を反応させたものを一次抗体として反応させ染色し陰性対照とした(吸収試験)。さらに、増殖性細胞のマーカー抗原として、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)を同様の方法で免疫組織化学的に染色したものをを用い、抗PCNA抗体にはパラフィン包埋切片で検出できるDAKO社のPC-10を用いた。

なお、統計学的検索には、paired t-testを用いた。

結 果

1. 正常口腔粘膜の免疫組織化学的所見

図1 正常口腔粘膜, 非再発症例群および再発症例群(初発時)におけるMT陽性率

再発症例群(初発時)のMT陽性率と正常口腔粘膜および非再発症例群のMT陽性率の間に0.5%の危険性で有意差が認められた

正常の重層扁平上皮(写真1-a)では、基底細胞層の細胞核および細胞質に強染色性のMT陽性細胞が認められた(写真1-b)。MT-E9抗体による正常口腔粘膜10例のMT陽性率は、最大46.8%, 最小30.2%, 平均は38.0±6.9%で(図1), MT陽性細胞の分布様式はPCNA陽性細胞とほぼ同様の分布様式を示した(写真1-c)。また、PCNAの陽性率は、平均15.2±2.4%であった(表3)。

2. 口腔粘膜扁平上皮癌非再発症例の免疫組織化学的所見

21症例のすべてにMT陽性細胞が認められ、腫瘍細胞の核または細胞質に反応がみられるもの、核および細胞質に反応がみられるのが確認できた。MT陽性細胞の分布様式は、腫瘍細胞巣周辺部にMT陽性細胞が確認できた(写真2-b)。陽性率は最大76.5%, 最小15.8%, 平均は40.8±21.4%であった(表1, 図1)。また、MT陽性細胞の分布様式は、PCNA陽性細胞と類似した分布様式を示していた(写真2-c)。また、PCNAの陽性率は、平均32.5±10.3%であった(表3)。

3. 口腔粘膜扁平上皮癌再発症例の初発時の免疫組織化学的所見

12症例のすべてにMT陽性細胞が認められ、腫瘍細胞の核または細胞質に反応が認められ、腫瘍細胞の核または細胞質に反応がみられるもの、核および細胞質に反応がみられるのが確認できた。MT陽性細胞の分布様式は、胞巣状に浸潤してい

写真1 正常口腔粘膜 (a. HE 染色, b. MT 染色, c. PCNA 染色) (×25)
基底細胞層に MT および PCNA 陽性細胞が認められる。

写真2 口腔粘膜扁平上皮癌非再発症例
高分化型, 浸潤様式3型, (a. HE 染色, b. MT 染色, c. PCNA 染色) (×50)
癌巣周辺部に MT および PCNA 陽性細胞が認められる。

写真3 口腔粘膜扁平上皮癌再発症例 (初発時), 高分化型, 浸潤様式4C型, (a. HE 染色,
b. MT 染色, c. PCNA 染色) (×50) 癌巣周辺部および結合組織内に索状に
浸潤している癌細胞に MT および PCNA 陽性細胞が認められる。

写真4 口腔粘膜扁平上皮癌再発症例（初発時），高分化型，浸潤様式4D型，（a. HE 染色，b. MT 染色，c. PCNA 染色）（ $\times 50$ ）結合組織内にびまん性に浸潤している癌細胞に MT および PCNA 陽性細胞が認められる。

写真5 口腔粘膜扁平上皮癌再発症例（再発時），中等度分化型，浸潤様式3型，（a. HE 染色，b. MT 染色，c. PCNA 染色）（ $\times 50$ ）癌巣全体に強い MT および PCNA 陽性細胞が認められる。

る腫瘍細胞では腫瘍胞巣周辺部に（写真3-b），また，索状および，び慢性に浸潤している部では，ほとんどの腫瘍細胞が MT 強陽性を示していた（写真4-b）。陽性率は最大94.0%，最小38.2%，平均は $70.1 \pm 19.0\%$ であった（表1，図1）。また，MT 陽性細胞の分布様式は，PCNA 陽性細胞と類似した分布様式を示していた（写真3-c，4-c）。再発症例の初発時 MT 陽性率と非再発症例の MT 陽性率の間に有意水準 0.5% 以下で有意な差が認められた（図1）。また，PCNA の陽性率は，平均 $54.6 \pm 16.5\%$ であった（表3）。

4. 口腔粘膜扁平上皮癌再発症例群における再発時の免疫組織化学的所見

口腔粘膜扁平上皮癌再発症例 9 例全例の腫瘍胞巣全体に MT 陽性細胞が確認できた（写真5-b）。MT 陽性率は最大 88.5%，最小 42.5%，平均は $76.8 \pm 18.6\%$ であった（表1，図2）。

再発症例群の初発時と再発時の MT 陽性率では，初発時と再発時との間には有意な差は認められなかった。しかしながら，各症例ごとにみると，MT 陽性率の増加のみられた 6 例の平均 MT 陽性率は $86.6 \pm 3.5\%$ で（▲），すべてが予後不良（腫瘍死）であった（図3）。それに対し，減少傾向を示した 3 例の平均 MT 陽性率は $57.1 \pm 22.0\%$ で（△），すべて予後良好（生存）であり（図2），その両者間には有意水準 1% 以下で有意な差が認められた。

図2 再発症例の初発時と再発時におけるMT陽性率
再発時、MT陽性率の増加傾向を示した6例のMT陽性率は $86.6 \pm 3.5\%$ で、減少傾向を示した3例のMT陽性率 $57.1 \pm 22.0\%$ との間に1%の危険率で有意差が認められた。

また、PCNAの陽性率は、平均 $58.2 \pm 15.2\%$ であった(表3)。

考 察

MTは1957年にMargoshesとValleeによってウマの腎臓中にカドミウム蛋白質として発見された、分子量6500～7000の、システイン残基を多く含む(全構成アミノ酸残基の約1/3)、熱安定性の多機能性金属蛋白質である¹⁾。MTはヒトをはじめとする脊椎動物の諸臓器中に存在する。正常動物の臓器組織中MT濃度は、一般に精巣、腎臓、肝臓、脾臓、小腸、脳で高値である^{1-3, 13-17)}。また、ラットにおける免疫組織化学的MTの発現に関しては、正常な肝・腎¹³⁻¹⁵⁾、前立腺¹⁶⁾、精巣、胎盤¹⁷⁾などで検討されており、生体内におけるMTの役割が徐々に解明されてきている。発現時期に関しては、胚発生期、胎児期、新生児期にMTの発現が強くみられ^{3, 5-12)}、さらに、細胞の核中MTの存在および細胞周期(S期)と関連したMTの誘導合成についての報告があり^{3, 4)}、増殖の盛んな胎児および、新生児の肝臓、再生肝などの細胞の核内に強い染色性が認められ¹³⁻¹⁵⁾ている。このような高い増殖能をもつ細胞におけるMT発現は、MTの生理機能の一つとしての必須微量元素であるCu, Zn代謝への関与が考えられている¹³⁻¹⁷⁾。また、実際に培養癌細胞においてもMTが誘導・発

現することが報告されている⁵⁾。また、口腔扁平上皮由来であるVX₂癌移植家兎における癌腫瘍へのCu, Znの集積、腫瘍の進行程度によるCu, Zn量の変動や、周囲筋からの取り込みがあるとの報告もある³⁹⁾。つまり、増殖力旺盛な癌細胞では、MT発現の可能性が高く、Cu, Znなどの必須微量元素代謝への関与も否定できない。

また、悪性腫瘍におけるMT発現については、抗癌化学療法との関連についての検討、すなわち、MTがシスプラチン、アドリマイシン、アルキル化剤をはじめとする抗癌剤に対する副作用軽減効果や抗腫瘍効果の減弱作用を有していることなど腫瘍治療の立場からも注目される^{19-31, 38)}。口腔領域の再発癌においても化学療法および放射線療法に対する耐性癌の存在は解明すべき問題である³²⁾。悪性腫瘍におけるMT誘導と抗癌化学療法との関連について²³⁻³²⁾、癌細胞自体に起因する抗癌剤耐性メカニズムとしては、癌細胞における薬剤の膜外排泄機構(p-glycoproteinの関与など)と、細胞内における薬剤不活性化作用(MT, glutation, glutathione-S-transferaseなどの関与)が重要な役割を果たしていると考えられ注目されている³²⁾。

今回検討を行った再発症例の初発時のMT陽性率に対し再発時には増加傾向を示し、増加傾向を示した6例中全例が腫瘍死であったことは、化学療法や放射線療法などの種々の抗癌治療を進めて

いくなかで残存癌細胞のMT量増加を招き、耐性を獲得した可能性が示唆される。逆に、減少傾向を示した3例の中で著明な減少をきたした2例については、いったん完治した部位に新たに癌細胞が出現してきた可能性も示唆される。また、初発時のMT陽性率に比べ再発時の陽性率が高くなった群で予後が悪く、減少した群で予後が良好であったことは、各症例におけるMT発現率の変化は予後推測の指標にも有用と考えられた。

临床上、抗癌剤および放射線耐性の要因は多岐にわたり、一概にMT誘導と抗腫瘍効果とを関連づけることは早計であるが、再発時のMT発現率の増加と再発時の抗癌化学療法および放射線療法の効果軽減からみて、抗癌剤および放射線耐性にMTの関与が推測された。

結 語

1. 口腔粘膜扁平上皮癌再発症例12例におけるMTの発現について、免疫組織化学的検討を加えた。

2. 再発症例における初発時のMT陽性率は、非再発症例に比べ、有意に高い値を示した。

3. 再発症例を各症例ごとにMT陽性率の変化を観察した場合、MT陽性率が増加傾向を示した症例は予後が悪く、減少傾向を示した症例は予後良好であった。

4. 以上の結果より、予後の推測に際し、MT発現の検索は、临床上腫瘍細胞の特性を知る上で意義のあるものと考えられ、予後推測の指標に有用と考えられた。

稿を終えるにあたり、資料を提供いただいた長崎大学歯学部附属病院検査室（口腔病理学教室：主任；岡邊治男教授）、ならびに、免疫染色の御指導をいただいた長崎大学医学部第三解剖学教室の和泉伸一先生、小路武彦助教授（主任；中根一穂教授）に心より感謝いたします。

本論分の要旨は、日本口腔腫瘍学会（第14回1996年鎌倉市）において発表した。

文 献

- 1) Kagi, J. H. R., Nordberg, M.: Metallothionein. Birkhauser Verlag, Basel, 1979.
- 2) Kagi, J. H. R., Kojima, Y.: Metallothionein II. Birkhauser Verlag, Basel, 1987.
- 3) Suzuki, K. T., Imura, N., et al.: Metallothionein III.

Birkhauser Verlag, Basel, 1993.

- 4) Cherian, M. G.: The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. Environ Health Perspect 102 (Suppl3): 131-135, 1994.
- 5) Bell, J. U.: A metallothionein-like protein in the hepatic cytosol of the term rat fetus. Toxicol Appl Pharmacol 48: 139-144, 1979.
- 6) Bremner L., Williams R. B., et al.: Distribution of copper and zinc in the liver of the developing fetus. Br J Nutr 38: 87-92, 1977.
- 7) Mason, M., Brady F. O., et al.: Metabolism of zinc and copper in the neonate: Acculation of Cu in the gastrointestinal tract of the new born rat. Br J Nutr 45: 391-399, 1981.
- 8) Riordan, J. R., Richards, V.: Human fetal liver contains both zinc and copper-rich forms of metallothionein. J Bio Chem 255: 5380-5384, 1980.
- 9) Ryden, L., Deutsch, H. F.: Preparation and properties of the major copper-binding component in human fetal liver. J Biol Chem 253: 519-524, 1978.
- 10) 青木康展, 鈴木和夫: メタロチオネイン遺伝子の発現調節と重金属代謝. 衛生化学 32(2): 70-84, 1986.
- 11) Glenn, D. S., Samuel, D. et al.: Alterations of gene expression in human colorectal cancer. Arch Surg 125: 493-497, 1990.
- 12) Kontozoglou, T. E., Banerjee, D. et al.: Immunohistochemical localization of metallothionein in human testicular embryonal carcinoma cell. Virchows Archiv A Pathol Anat 415: 545-549, 1989.
- 13) Nishimura, H., Nishimura, H., et al.: Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues. J Histochem Cytochem 37: 715-722, 1989.
- 14) Karin, M. and Herschman, H. R.: Dexamethasone stimulation of metallothionein synthesis in Hela cell culture. Science 204: 176-177, 1979.
- 15) Tohyama, C., Nishimura, H., et al.: Immunohistochemical localization of metallothionein in the liver and kidney of cadmium or zinc treated rats. Act Histochem Cytochem 21: 91-102, 1988.
- 16) Danielson, K. G., Ohi, S., et al.: Immunohistochemical localization of metallothionein in rat liver and kidney. J Histochem Cytochem 30: 1033-1039, 1982.
- 17) Umeyama, T., Saruki, K., et al.: Immunohistochemical demonstration of metallothionein in the rat prostate. Prostate 10: 257-264, 1987.
- 18) Roelfzema, H. W., Tohyama, C., et al.: Quantitative immunohistochemistry of metallothionein in rat placenta. Histochem 90: 365-369, 1989.
- 19) 永沼 章, 井村伸正: メタロチオネインの示す薬物毒性軽減とその医療への応用. 蛋白質・核酸・酵素 32: 1031-1040, 1987.

- 20) Nagamuma, A., Satoh, M. et al.: Prevention of lethal and renal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum by induction of metallothionein synthesis without compromising its antitumor activity in mice. *Cancer Res.* 983-987, 1987.
- 21) 陳 瑞東, 黒川賀重, 他: 次硝酸ビスマスによるCisplatinの腎毒性軽減に関する臨床的検討—特に腎毒性軽減効果について—. *日産婦誌*, 39(5): 815-822, 1987.
- 22) 森川利昭, 河村栄二, 他: 次硝酸ビスマス大量投与方法によるシスプラチンの副作用軽減効果とビスマスおよびプラチナの薬動力学的検討. *J Jpn Soc Cancer Ther* 25(6): 1138-1145, 1990.
- 23) 井村伸正, 永沼 章, 他: 新しい標的と抗癌剤耐性, 抗癌剤耐性とメタロチオネイン. *癌と化学療法* 16: 599-604, 1989.
- 24) Kelly, S. L., Basu, N. et al.: Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 241: 1813-1815, 1988.
- 25) Bakka, A., Endresen, L. et al.: Resistance against cis-dichlorodiammineplatinum in cultured cells with a high content of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 61: 215-226, 1981.
- 26) Thornalley, P. J. and Vasak, M.: Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress, kinetics and hydrogen radicals. *Biochem Biophys Acta* 827: 36-44, 1985.
- 27) Teicher, B. A., Holden, S.A. et al.: Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Res* 47: 388-393, 1987.
- 28) Basu, A. and Lazo, J.S.: A hypothesis regarding the protective role of metallothionein against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs. *Toxicol Lett* 50: 123-135, 1990.
- 29) 雑賀隆史, 津島知靖, 他: 膀胱癌および腎癌におけるMetallothioneinの免疫組織学的検討. *日泌尿会誌* 83(5): 636-642, 1992.
- 30) 雑賀隆史: 膀胱腫瘍におけるMetallothioneinの発現に関する研究. *日泌尿会誌* 83(5): 643-649, 1992.
- 31) Farnworth, G. P., Hillcoat, B.L. et al.: Metallothionein induction in mouse tissue by cis-dichlorodiammineplatinum (II) and its hydrolysis products. *Chem Biol Interact* 69: 319-332, 1989.
- 32) 鈴木日出夫: 抗癌剤の耐性機序とその克服をめざして. *蛋白質・核酸・酵素* 33: 400-406, 1988.
- 33) 今井 裕, 佐々木忠昭, 他: 頭頸部扁平上皮癌における抗PCNA抗体による免疫組織学的検討. *口腔腫瘍* 7(1): 1-8, 1995.
- 34) 黒川英雄, 山下善弘, 他: 口腔扁平上皮癌におけるPCNAの免疫組織化学的検討. *口腔腫瘍* 7(1): 9-14, 1995.
- 35) 小宮山和正: 舌癌の増殖能に関する免疫組織化学的研究: Ki-67抗原発現と組織学的悪性度との関連性について. *日口外誌* 41(3): 179-190, 1995.
- 36) Endresen, L., Bakka, A., et al.: Increased resistance to Chlorambucil in Cultured cell with high concentration of cytoplasmic metallothionein. *Cancer Res* 43: 2918-2926, 1983.
- 37) 長坂公治: VX₂癌移植家兎における血漿および諸組織中の亜鉛・銅量に関する研究. *九州歯会誌* 32(6): 833-851, 1979.
- 38) 伊藤道一郎, 高野美貴子, 他: UFTR®内服治療が奏功した高齢者下顎歯肉癌の1例. *口腔腫瘍* 9(4): 282-287, 1997.
- 39) 草場威稔夫: 亜鉛および銅代謝からみた担癌生体. *日外会誌* 81: 1167-1168, 1980.
- 40) Pindborg, J. J., Reichart, P.A., et al.: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa, second ed, Springer, 1997, 11-16.

Immunohistochemical study on induction of metallothionein in recurrent cases of squamous cell carcinoma of oral mucosa

Michi - ichirou Itoh, Chikara Miyazaki, Takeshi Kamiya,
Nobuyuki Baba, Yoshihiro Kuga and Akio Mizuno

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nagasaki University,
School of Dentistry
(Chief: Prof. Akio Mizuno)

Abstract

Metallothionein (MT) is a metal-binding protein with a low molecular weight (6000–7500), and is implicated in abnormal cell growth in some cancers. In the present study, the relationship between MT expression and the clinical features in oral squamous cell carcinomas was investigated. In 12 recurrent cases of oral cancer, the expression of MT was examined immunohistochemically in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using the avidin-biotin peroxidase complex method.

The percentages of MT positive cells in tissue sections from nonrecurrent cases (n=21), and recurrent cases (n=12) were 40.8% and 70.1%, respectively. Between these values, a significant difference was recognized.

Furthermore, in recurrent cases, the percentage of MT positive cells was 70.1% for primary cases (n=12), and 76.7% for recurrent cases (n=9). Between these values, no significant difference was recognized. However, among 9 recurrent cases, 6 patients with increasing MT percentages died, whereas 3 patients with decreasing MT percentages survived.

In summary, immunohistochemical examination of MT in the primary lesion and recurrent lesion of tumors is useful for understanding the biological degree of malignancy of oral squamous cell carcinomas in clinical practice, and may be useful for selecting future treatment and evaluating the patient's prognosis.

Key words : metallothionein, squamous cell carcinoma, recurrence

Requests of reprints to : Dr. Itoh, M., First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,
Nagasaki University, 1-7-1, Sakamoto, Nagasaki, 852-8102 Japan