原 著

ヒト唾液腺多形性腺腫における間質型（I）および軟骨型（II, IX）コラーゲン分布の免疫組織化学的検索

フロレス ルナ マリア グアダルッペ

東京医科歯科大学歯学部口腔病理学講座（主任：高木 実教授）

（1995 年 12 月 8 日 受付）

Immunohistochemical Localization of Type I, II and IX Collagens in Pleomorphic Adenoma of Human Salivary Glands

Maria Guadalupe Flores Luna

Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Chief : Prof. Minoru Takagi)

The expression patterns of type I, II and IX collagens in chondromyxoid tissue of salivary pleomorphic adenomas were examined by immunohistochemistry. In the early stage of cartilage development, type IX collagen was detected intracytoplasmically, mainly in the proliferating myoepithelial cells and not in the extracellular matrix. Proliferating myoepithelial cells did not show chondrocytic characteristics at this stage. Type I and II collagens were co-distributed in the extracellular matrix of myxoid tissue. In the chondroid tissue, variable immunostaining patterns of type I and II collagens were also observed. Some proliferating myoepithelial cells in myxoid and chondroid tissue were immunostained with anti- α -smooth muscle actin antibody indicating their myoepithelial origin. These results suggested that proliferating myoepithelial cells may be the origin of the chondroid tissue and the expression of type IX collagen in cartilaginous tissue precedes the expression of type I and II collagens.

I. 緒 言

大小唾液腺に発生し最も頻度の高い良性腫瘍である多形性腺腫（pleomorphic adenoma : PA）は、上皮組織由来の腫瘍であり、筋上皮細胞および導管細胞に分化できる多機能的な介在導管細胞から発生すると考えられている¹⁻⁴⁾。

多形性腺腫は、粘液腫様、軟骨様組織、硝子様組織 およびまれには骨様組織を腫瘍間質として有することが特徴である⁵⁾。

ヒトの乳腺においては多形性腺腫は主に女性に生じるが、頻度の低い腫瘍であり、骨化生が病理組織学的特徴である点に違いがあるものの唾液腺にできる多形性腺腫と非常に類似している⁶⁾。

ラットの唾液腺腺腫の実験では、筋上皮細胞が多形性腺腫の腫瘍発生に重要な役割を果たしていることが示唆されている⁷⁾。超微細構造と免疫組織化学の検索により、介在導管にみられる筋上皮細胞は筋特異的なアクチン、ミオシンを含み、サイトケラチン陽性であることが証明された^{8,9)}。正常

発生下では硝子軟骨の形成は、間葉細胞が集合し、軟骨細胞系へと分化した時に生じる¹⁰⁾。

硝子軟骨は種々の型のコラーゲン、プロテオグリカンおよび他の蛋白成分を含んでおり、コラーゲンは少なくとも遺伝子的に異なった5種の分子、II, VI, IX, X, XI型が主要な成分である。I型コラーゲンは線維芽細胞および骨芽細胞で産生される主要なコラーゲンで、皮膚、腱、靱帯、骨、骨膜など広い組織分布が認められる^{11,12)}。II型コラーゲンは $\alpha 1$ (II)鎖のホモトライマーであり、軟骨基質の主な線維性成分である^{13,14)}。また、IX型コラーゲンは硝子軟骨および胎児軟骨に見い出され¹⁵⁾、分子は $\alpha 1$ (IX)鎖、 $\alpha 2$ (IX)鎖と $\alpha 3$ (IX)鎖の3つの遺伝子産物からなり、各鎖は4つの非ヘリカル領域を含む特異なコラーゲンである。IX型コラーゲンはII型コラーゲン線維上で共有結合しており^{16,17)}、II型コラーゲン線維の太さを調節し、さらに細胞周囲のマトリックスとの相互作用をも調節する役割を果たしているようである^{16,18,19)}。

本研究は軟骨組織の発生および調節機構を明らかにするために、ヒト唾液腺多形性腺腫の化生軟骨における軟骨型(II, IX型)コラーゲンおよび間質型(I型)コラーゲンの発現を免疫組織学的手法を用いて検索したところ、ヒト唾液腺多形性腺腫における軟骨化生でも、犬乳腺多形性腺腫^{20,21)}と同様に軟骨型コラーゲンが新たに発現されたことを明らかにした。

II. 材料および方法

1. 試料

唾液腺多形性腺腫患者20例および正常顎下腺3例から採取した組織をただちにメタノール・カルノワ溶液中で4℃1～2時間固定した。正常ヒト新生児肋軟骨組織は4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)中で上記と同様に固定した。固定組織は脱水、キシレンで透徹後、パラフィン(Paraplast Xtra, 融点56～57℃)に包埋した。標本は4μmの厚さに薄切し、ヘマトキシリン-エオジンおよびアルシアンブルー

(pH 2.5)で染色し、試料中の粘液腫様組織および軟骨様組織の存在と分布を検索し、16例につき免疫組織学的検索を行った。

2. 免疫組織染色用一次抗体

一次抗体は、ヒトの皮膚由来I型コラーゲンに対する単クローン抗体(マウスIgG, 1:500希釈, コスモ社)、ヒト肋軟骨由来抗II型コラーゲンに対する単クローン抗体(マウスIgG, 1:250希釈, 富士薬品工業)、ヒト硝子軟骨由来IX型コラーゲンに対するポリクローン抗体(ラットIgG, 1:50希釈, 金沢大学川島篤弘博士から供与)、 α -smooth muscle actin (α -SMA)に対する単クローン抗体(マウスIgG, 1:50希釈, Dakopatts, Denmark)およびサイトケラチンKL1に対する単クローン抗体(マウスIgG, 1:200希釈, コスモ社)を使用した。抗 α -SMA抗体と抗サイトケラチン抗体は正常筋上皮細胞および導管細胞のマーカーとして使用した。なお抗I型コラーゲン抗体と抗II型コラーゲン抗体間の交叉反応がないことはELISA法にて確認した。

3. 免疫組織染色

免疫組織染色は上記一次抗体、ビオチン化二次抗体およびアビジン化ペルオキシダーゼを用いるABC法(ベクスタチンキット, ベクター社)にて行った。組織切片は常法により脱パラフィン後、50mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.6/0.15M NaCl (トリス-生食液)で洗浄した。内因性ペルオキシダーゼを除去するために、組織切片を0.5%過ヨウ素酸溶液に室温で30分浸し、ついで0.5%カゼイン/トリス-生食液で37℃, 1時間反応した。一次抗体を添加し4℃一晩静置した。但し、I, II, IX型コラーゲンに対する抗体との免疫反応では、軟骨組織中のプロテオグリカン(酸性ムコ多糖)による抗原決定基のマスクを除去する目的で²²⁾5%ヒアルロニダーゼ(ウシ睾丸由来, シグマ社)/酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0 で37℃, 30分間反応した。トリス-生食液で洗浄後二次抗体(ビオチン化抗マウスIgG ウマ抗体/トリス-生食液で希釈1:200)を添加し、37℃1時間反応した。トリス-生食液で洗浄後ペルオキシダーゼ標識ビオチ

ン-アビジン複合体 (1:100) とさらに 1 時間室温にて反応した。組織切片は過酸化水素水 (0.03%) 添加ジアミノベンチジンを基質として発色させ、ヘマトキシリンにて対比染色を施し (1~2 秒)、脱水、透徹後 HRS (ミドリ十字社) にて封入した。陰性対照として特異的一次抗体のかわりに正常マウスの血清を希釈して使用した。

III. 結 果

多形性腺腫は顎下腺、耳下腺、上口唇腺、口蓋腺から採取した 16 例を検索した (表 1)。患者の年齢および性別は 22~77 歳、男性 7 例、女性 9 例であった。得られた多形性腺腫組織 16 例の組織学的検索ではこの腫瘍に特徴的な多彩な像、すなわち腫瘍細胞、粘液腫様組織、軟骨様組織、および硝子様組織が混在する腺腫様部位が認められた。腺腫様部分では、腺管形成をする細胞として 2 種すなわち、内層上皮細胞および外層上皮細胞が認めることがあり、また充実性細胞集塊を形成する

こともある。粘液腫様組織と軟骨様組織の分布の比率は個々の症例で変化が認められた。

1. 多形性腺腫の免疫組織化学的検索

多形性腺腫組織における各型 (I, II, IX) コラーゲンの抗体に対する免疫組織染色像の観察結果を表 2 に示した。

多形性腺腫の免疫組織化学的検索では、粘液腫様組織で増殖性筋上皮細胞に IX 型コラーゲンが細胞形質内に強陽性に検出されたが、細胞外マトリックスには観察されなかった (図 1a)。この粘液腫様組織では増殖性筋上皮細胞は軟骨細胞様の性状を示さなかった。これらの症例の内、症例 2 は腺管外層上皮細胞および充実性細胞集塊が抗 IX 型コラーゲン抗体で染色されなかったが、この組織標本には粘液腫様組織が乏しく軟骨様組織が主であった。

II 型コラーゲンについては新生児肋軟骨が、抗 II 型コラーゲン抗体により中等度に陽性像を示した。多形性腺腫の粘液腫様組織の細胞外マトリッ

表 1 唾液腺に発生した多形性腺腫 16 例の軟骨粘液腫様組織の分布

症例 番号	年齢	性	部位	組織学的特徴	
				粘液腫様組織	軟骨様組織
1	38	女	顎下腺	+	+
2	39	男	顎下腺	+	+
3	42	男	口蓋腺	+	+
4	53	女	耳下腺	+	◇
5	40	女	耳下腺	+	+
6	24	女	耳下腺	+	+
7	24	女	顎下腺	+	+
8	51	女	口蓋腺	+	◇
9	41	男	耳下腺	+	+
10	77	男	口蓋腺	+	◇
11	37	男	耳下腺	+	+
12	60	男	耳下腺	+	+
13	75	女	口蓋腺	+	+
14	47	女	顎下腺	+	+
15	52	女	口蓋腺	+	◇
16	58	男	上口唇腺	+	+

+ detected, ◇ non-detected

表2 唾液腺に発生した多形性腺腫16例のI, II, IX型コラーゲンの免疫組織化学的検索

症例 番号	コ ラ ー ゲ ン						
	I 型		II型		IX型		
	粘液腫様 組織	軟骨様 組織	粘液腫様 組織	軟骨様 組織	増殖性腺管 内層上皮 外層上皮 細胞 細胞		粘液腫様 組織
1	++	+++	++	+++	—	+++	+++
2	++	+++	++	+++	—	—	—
3	++	+++	++	+++	—	+++	+++
4	+++	◇	—	◇	—	+	+
5	++	+++	++	+++			
6	++	+++	++	++			
7	++	+++	++	++			
8	++	◇	—	◇			
9	++	+++	++	+++			
10	++	◇	—	◇			
11	++	+++	++	+++			
12	+++	++	+	+++			
13	++	+++	—	+			
14	+++	+++	++	+++			
15	+++	◇	++	◇			
16	+++	+++	++	+++			

—, +, ++, +++ : 染色程度 (—陰性, +軽度, ++中等度, +++高度)。◇検索不能

クスでは抗II型コラーゲン抗体に対して中等度に染色像が観察された(図1b)。さらにこの粘液腫様組織の細胞外マトリックスでは抗I型コラーゲン抗体が種々の異なった陽性染色像を示した(図1c)。増殖性腺管外層上皮細胞に抗IX型コラーゲン抗体が強陽性染色に観察された(図2a)。充実性細胞集塊および増殖性腺管周囲上皮細胞は、筋上皮細胞のマーカーである α -SMAに強陽性であった(図2b)。また血管壁も α -SMAに陽性であった。

多形性腺腫の軟骨様組織では抗IX型コラーゲン抗体に対して細胞外マトリックスに軽度の染色像が観察されたが、軟骨細胞は全く染色されなかった(図3a)。軟骨様組織で細胞外マトリックスは抗II型コラーゲン抗体で種々の異なった陽性像を

示した(図3b)。さらに抗I型コラーゲン抗体で強い陽性像が観察された(図3c)。I型およびII型コラーゲンはともにこれら軟骨粘液腫様組織の細胞外マトリックスに分布していた。陰性対照(正常マウス血清使用)では、いずれも陽性染色像は認められなかった。

IV. 考 察

本研究の結果の要約を図4に示す。唾液腺多形性腺腫の軟骨様の組織発生過程における各型コラーゲン発現の移行のパターンを示している。IX型コラーゲンは粘液腫様組織において増殖性筋上皮細胞の細胞質内に認められ、細胞外マトリックスへの沈着は認められなかった。またこの粘液腫様組織での増殖性筋上皮細胞は軟骨細胞様の染色

図1 多形性腺腫の粘液腫様組織の免疫組織化学的所見

- a) 増殖性筋上皮細胞に抗IX型コラーゲン抗体に対して陽性所見がみられた(アローヘッド)。
b) 粘液腫様組織の細胞外マトリックスに抗II型コラーゲン抗体に対して陽性所見がみられた。
c) bと同様、細胞外マトリックスに抗I型コラーゲン抗体に対して陽性所見がみられた。a ~ c: ×270

図2 増殖性腺管の免疫組織化学的所見

- a) 増殖性筋上皮細胞では抗IXコラーゲン抗体に対して陽性所見がみられた(アローヘッド)
b) 増殖性腺管外層上皮細胞では抗 α -SMA抗体に対して陽性所見がみられた(アローヘッド)。a, b: ×420

像を示さなかった。さらにIX型コラーゲンは増殖性腺管外層上皮細胞にも検出された。I型およびII型コラーゲンは粘液腫様組織および軟骨様組織の細胞外マトリックスに両者ともに局在していた。これらの結果はIX型コラーゲンがI型およびII型コラーゲンの沈着前に検出されることを意味しているが、Swiderski ら²³⁾は、肋軟骨においてIX型コラーゲンとII型コラーゲンは同時発現し、IX型コラーゲンはII型コラーゲン線維に共重合されると報告している¹⁸⁾。

ヒト乳腺多形性腺腫は頻度の低い良性腫瘍であるが⁶⁾、イヌの乳腺多形性腺腫は頻度が高い腫瘍であることが知られている²⁰⁾。乳腺は唾液腺のよ

図3 軟骨様組織の免疫組織化学的所見

- a) 抗IX型コラーゲン抗体に対して染色所見がみられなかった。アローヘッドは軟骨細胞を示す。
 b) 抗II型コラーゲン抗体に対して染色所見がみられた。
 c) 抗I型コラーゲン抗体に対して染色所見がみられた。a～c: ×270

図4 唾液腺多形性腺腫の軟骨粘液腫様組織の発生過程におけるIX型、I型およびII型コラーゲン発現のパターン

うな上皮組織由来の腺である⁷⁾。光学顕微鏡的観察によると、乳腺の多形性腺腫は骨化生性組織が形成される点でヒト唾液腺多形性腺腫と差異があるが基本的には両者はよく似ている。Arai ら²⁰⁾は、これまでイヌ乳腺多形性腺腫の軟骨様組織においてII型コラーゲンの沈着があることを報告している。さらに最近の免疫組織学的検索においてイヌ乳腺多形性腺腫の早期の軟骨様組織の発生過程でIX型コラーゲンの発現が証明されている²⁴⁾。IX型コラーゲンは種特異的ならびに組織特異的な発生をしたと考えられる病理像を示す。ヒト唾液腺多形性腺腫のII型およびIX型コラーゲンの発現の時間経過からみるとIX型コラーゲンは軟骨細胞へと分化する増殖性筋上皮細胞のよいマーカーとなると示唆され、このIX型コラーゲンはごく早期の軟骨様組織の発生において増殖促進作用のような重要な役割を果たしているかもしれない。数種の細胞系においてII型およびIX型コラーゲンの発現と腫瘍抑制遺伝子の関連が報告されている²⁵⁾。Kawashima ら²⁶⁾は内生軟骨腫および原発性軟骨

肉腫の軟骨組織において、IX型コラーゲンは他の型のコラーゲンが発現する前に不規則に分布しており、IX型コラーゲンが腫瘍の悪性度の決める情報を与える可能性を示唆している。

本研究においては、免疫組織化学的手法によって、I型およびII型コラーゲンが軟骨粘液腫様組織とともに局在していることを明らかにした。現在予備的な *in situ* ハイブリダイゼーション実験ではI型コラーゲンのmRNAが粘液腫様組織の増殖性筋上皮細胞に低レベルではあるが検出されている(未発表データ)。この予備実験のデータはI型コラーゲンが増殖性筋上皮細胞により産生された可能性を示唆している。

Takeuchi ら²⁷⁾およびNara ら²⁸⁾は粘液腫様部位にプロテオグリカンおよび他の糖蛋白質が存在していることを同定した。これらの物質の産生における筋上皮細胞の役割は最終的には証明されていないが、プロテオグリカンおよび糖蛋白質の存在は増殖性筋上皮細胞が軟骨様組織の発生に関与している可能性を示唆する。一方、Arai ら²⁹⁾は増殖性筋上皮細胞はアルシアンブルー陽性の結節塊を形成することを示した。本研究の症例でもアルシアンブルー陽性酸性ムコ多糖が軟骨様組織に検出されている(未発表データ)。

V. 結 論

本研究の結果は増殖性筋上皮細胞が軟骨粘液腫様組織の起源細胞であり、増殖腺管の外層上皮細胞に陽性所見を認めることは介在導管由来の増殖性筋上皮細胞から、細胞質にIX型コラーゲンを産生する軟骨細胞が生ずる可能性を示唆している。この軟骨細胞は、さらに細胞外マトリックスに沈着するI型およびII型コラーゲン産生へと遺伝子発現が切り替わると考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜った本学口腔病理学講座高木 実教授に深く感謝いたします。また、懇切なるご教示を賜りました難治疾患研究所異常代謝部門、永井 裕名誉教授、

堀 久枝博士に感謝の念を表します。また、種々のご助言をいただきました口腔病理学講座、勝部憲一博士に深謝いたします。また、ご教示を賜りました東京農業工業大学硬蛋白質利用研究施設新井克彦助教授に深謝いたします。さらに、本研究にご協力いただきました口腔病理学講座の皆様および難治疾患研究所異常代謝部門木村彰方教授と研究室の皆様にお礼申し上げます。

また、抗IX型コラーゲン抗体をご恵与下さいました金沢大学医学部病理講座中西功夫教授、川島篤弘博士ならびに正常ヒト新生児軟骨組織をご恵与下さいました日本赤十字医療センター検査部武村民子部長に感謝いたします。

文 献

- 1) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyasaki T.: A myoepithelial cell line established from a human pleomorphic adenoma arising in minor salivary gland. *Cancer* 45: 297-305, 1980.
- 2) Harrison, J. D. and Auger, D. W.: Ultrastructural observations on luminal structures of pleomorphic adenoma of parotid and submandibular salivary glands of man. *Virchows Archiv A Pathol Anat.* 415: 559-563, 1989.
- 3) Nathrath, W. B., Wilson, P. D. and Trejdosiewicz, L. K.: Immunohistochemical localisation of keratin and luminal epithelial antigen in myoepithelial cells of human mammary and salivary gland tumours. *Path Res Pract.* 175: 279-288, 1982.
- 4) Dardick, I., Gliniecki, M. R., Heathcote, J. G. and Burford-Mason, A.: Comparative histogenesis and morphogenesis of mucoepidermoid carcinoma and pleomorphic adenoma. An ultrastructural study. *Virchows Archiv A Pathol Anat.* 417: 405-417, 1990.
- 5) Ellis, G. L., Auclair, P. L. and Gnepp, D. R.: *Surgical Pathology of the Salivary Glands*. Philadelphia, PA., 1991, W. B. Saunders, Co., 108-125.
- 6) Ballance, W. A., Ro, J. Y., El-Naggar, A. K., Grignon, D. J., Ayala, A. G. and Romsdahl, M. G.: Pleomorphic adenoma (benign mixed tumor) of the breast. An immunohistochemical, flow cytometric, and ultrastructural study and review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 93: 795-801, 1990.
- 7) Dardick, I., van Nostrand, A. W. P. and Phillips, M. J.: Histogenesis of salivary gland

- pleomorphic adenoma (mixed tumor) with an evaluation of the role of the myoepithelial cell. *Hum Pathol.* 13 : 62-75, 1982.
- 8) Dardick, I., Rippstein, P., Skimming, L., Boivin, M., Parks, W. R. and Dairkee, S. H. : Immunohistochemistry and ultrastructure of myoepithelium and modified myoepithelium of ducts of human major salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 64 : 703-715, 1987.
 - 9) Palmer, R. M. and Lucas, R. B. : Immunocytochemical identification of cell types in pleomorphic adenoma, with particular reference to myoepithelial cells. *J Pathol.* 146 : 213-220, 1985.
 - 10) Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Gitelman, S. E. and Derynck, R. : Toward a molecular understanding of skeletal development. Review. *Cell* 80 : 371-378, 1995.
 - 11) Yasui, N., Ono, K., Yamaura, I., Konomi, H. and Nagai, Y. : Immunohistochemical localization of type I, II and III collagens in the ossified posterior longitudinal ligament of the human cervical spine. *Calcif Tissue Int.* 35 : 159-163, 1983.
 - 12) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. : *Molecular Biology of the Cell.* New York, 1994, Garland Publishing Inc., 978-980.
 - 13) Mundlos, S., Engel, H., Michel-Behnke, I. and Zabel, B. : Distribution of type I and type II collagen gene expression during the development of human long bones. *Bone* 11 : 275-279, 1990.
 - 14) Yasui, N., Ono, K., Konomi, H. and Nagai, Y. : Transitions in collagen types during endochondral ossification in human growth cartilage. *Clin Ortho.* 183 : 215-218, 1984.
 - 15) Wu, J.-J., Woods, P. E. and Eyre, D. R. : Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem.* 267 : 23007-23014, 1992.
 - 16) Van der Rest, M. and Mayne, R. : Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J Biol Chem.* 263 : 1615-1618, 1988.
 - 17) Vasios, G., Nishimura, I., Konomi, H., Van der Rest, M., Ninomiya, Y. and Olsen, B. R. : Cartilage type IX collagen-proteoglycan contains a large amino-terminal globular domain encoded by multiple exons. *J Biol Chem.* 263 : 2324-2329, 1988.
 - 18) Nishimura, I., Muragaki, Y. and Olsen, B. R. : Tissue-specific forms of type IX collagen-proteoglycan arise from the use of two widely separated promoters. *J Biol Chem.* 264 : 20033-20041, 1989.
 - 19) Van der Rest, M. and Garrone, R. : Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5 : 2814-2823, 1991.
 - 20) Arai, K., Uehara, K. and Nagai, Y. : Expression of type II and type XI collagens in canine mammary mixed tumors and demonstration of collagen production by tumor cells in collagen gel culture. *Jpn J Cancer Res.* 80 : 840-847, 1989.
 - 21) Arai, K., Uehara, K. and Nagai, Y. : Cartilaginous-type collagen expression in mixed tumor (pleomorphic adenoma). *In vivo and in vitro* studies. *Ann New York Acad Sci.* 580 : 586-588, 1990.
 - 22) Ye, X. J., Terato, K., Nakatani, H., Cremer, M. A. and Yoo, T. J. : Monoclonal antibodies against bovine type IX collagen (LMW fragment) : production, characterization, and use for immunohistochemical localization studies. *J Histochem Cytochem.* 39 : 265-271, 1991.
 - 23) Swiderski, R. E. and Solursh, M. : Localization of type II collagen, long form $\alpha 1(\text{IX})$ collagen, and short form $\alpha 1(\text{IX})$ collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton. *Develop Dyn.* 194 : 118-127, 1992.
 - 24) Arai, K., Uehara, K. and Nagai, Y. : Simultaneous expression of type IX collagen and an inhibin-related antigen in proliferative myoepithelial cells in pleomorphic adenoma of the canine mammary gland. *Jpn J Cancer Res.* 86 : 577-584, 1995.
 - 25) Cizdziel, P. E., Hosoi, J., Montgomery, J. C., Wiseman, R. W. and Barret, J. C. : Loss of a tumor suppressor gene function is correlated with downregulation of chondrocyte-specific collagen expression in syrian hamster embryo cells. *Mol Carcin.* 4 : 14-24, 1991.
 - 26) Kawashima, A., Ueda, Y., Tsuchiya, H., Tomita, K., Nagai, Y. and Nakanishi, I. : Immunohistochemical localization of collagenous proteins in cartilaginous tumors : characteristic distribution of type IX collagen. *J Cancer Res Clin Oncol.* 120 : 35-40, 1993.
 - 27) Takeuchi, J. and Kato, Y. : Pleomorphic adenoma of salivary gland, with special reference to histochemical and electron microscopic

- studies and biochemical analysis of glycosaminoglycans *in vivo* and *in vitro*. Cancer 36 : 1771-1789, 1975.
- 28) Nara, Y., Takeuchi, J., Yoshida, K., Fukatsu, T., Nagasaka, T., Kawaguchi, T., Meng, N., Kikuchi, H. and Nakashima, N. : Immunohistochemical characterization of extracellular matrix components of salivary gland tumors. Br J Cancer. 64 : 307-314, 1991.