皮膚上皮性悪性腫瘍

皮膚上皮性悪性腫瘍における I, III, IV, V 型コラーゲン, ラミニンの免疫組織学的局在

小林 裕美*¹ 石井 正光*¹ 深井 和吉*¹ 茶之木美也子*¹
濱田 稔夫*¹ 村垣 泰光*² 大島 章*²

Summary

Basal cell epithelioma (BCE), Bowen's disease (BD), squamous cell carcinoma (SCC) における I, III, IV, V 型コラーゲン, ラミニンの分布と存在形態を間接蛍光抗体法, 免疫電顕法により検索した。その結果, 抗 I, III, V 型コラーゲン抗体はいずれも間質の全てのコラーゲン線維に反応した。抗 IV 型コラーゲン抗体, 抗ラミニン抗体は, BD, common type BCE では, 腫瘍細胞巣と間質の境界部に線状に陽性であったが, 再発例を含む fibrosing BCE, SCC では, 断裂や欠損, 或いは肥厚や重層化等の異常な存在形態を著明に示した。断裂像は良性腫瘍でも認められ, 必ずしも悪性を意味する所見ではないが, 存在形態の異常の発現の頻度は腫瘍の悪性度に並行した。

緒 言

腫瘍の浸潤, 転移の機構の解明上, 腫瘍と周囲結合組織との関係を明らかにすることは重要である。実際, 種々の上皮性腫瘍の発生の前後において間質が変化することは多くの研究者の知るところである¹⁾⁻³⁾。

間質の主要成分であるコラーゲンには遺伝子レベルで異なる数種の分子種が存在するが, 近年, この型別のコラーゲンを抽出することが可能となった⁴⁾⁻⁶⁾。われわれは型別コラーゲンに対する抗体を用い, 正常ヒト皮膚における I, III, IV, V 型コラーゲンの局在を検索し, I,

III, V 型コラーゲンは真皮に, IV 型コラーゲンは主として基底膜に存在することを報告してきた⁷⁾⁻⁹⁾。今回この結果をもとに basal cell epithelioma (BCE), Bowen's disease (BD), squamous cell carcinoma (SCC) における結合組織成分の免疫組織学的局在を, 抗各型コラーゲン抗体および基底膜成分については抗ラミニン抗体をも用い検索したので報告する。

材料および方法

組織標本: 35 歳から 77 歳までの 17 人 18 個の BCE, 56 歳から 89 歳まで 7 人の BD, 48 歳から 81 歳まで 11 人 12 個の SCC, 対照として 2 歳から 85 歳まで 27 人の被覆部および非被覆部 61 ヲ所の正常皮膚, 良性腫瘍の seborrheic keratosis 7 例の手術時採取標本を用いた。検体は採取直後に分割し, OCT compound (Lab Tek products division, Miles Laboratories Inc., Naperville)

*¹ Hiromi KOBAYASHI, Masamitsu ISHII, Kazuyoshi FUKAI, Miyako CHANOKI, Toshio HAMADA: 大阪市立大学皮膚科学教室

*² Yasuteru MURAGAKI, Akira OOSHIMA: 和歌山県立医科大学第一病理学教室

に包埋し、液体窒素中で急速凍結したものを蛍光抗体法に、periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定したものを電顕酵素抗体法に、ホルマリン固定したものを通常の光顕的観察用に供した。

抗体：ヒト胎盤をペプシン処理後分離抽出し、精製したⅠ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型コラーゲンを家兎に免疫し抗各型コラーゲンポリクローナル抗体を、Köhler & Milsteinの方法¹⁰⁾により抗Ⅲ、Ⅳ型コラーゲンモノクローナル抗体を得た。得られた抗体の特異性はenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により各々他のコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのいずれとも交差反応を示さないことを確認した。抗ラミニンモノクローナル抗体はコスモバイオケミカル社製のものを使用した。

間接蛍光抗体法：4 μ mの凍結切片に一次抗体として上述の抗各型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体を、二次抗体として各一次抗体に対応してaffinity purified FITC conjugated goat F(ab')₂ anti-rabbit IgG (TAGO), anti-mouse IgG (TAGO), anti-rat IgG (Cappel) を用い間接蛍光抗体法を施行し、Nikon社製蛍光顕微鏡VFD-Rにて観察した。

電顕酵素抗体法：PLP固定標本は6 μ mの凍結切片とし、一次抗体の抗各型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体、次にperoxidase標識した二次抗体を各々反応させ、1% glutaraldehyde固定し、Graham-Karnovsky液にて発色させた。2% OsO₄にて後固定し型どおりethanolで脱水、Epon812に包埋した。Ultra-microtomeにて超薄切片を作製し無染色、鉛染色および鉛ウラン重染色を施したものをHitachi HS-9透過型電子顕微鏡にて観察した。

成 績

(1) 抗Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ型コラーゲン抗体の反応形態

a) 正常ヒト皮膚；

正常ヒト皮膚においては抗Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ型コラーゲン抗体のいずれも真皮全層に反応した。

b) 良性皮膚腫瘍 (SK)；

良性皮膚腫瘍 (SK) では抗Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ型コラーゲン抗体のいずれも間質の全てのコラーゲン線維に反応した。

c) BCE, BD, SCC；

BCE, BD, SCCのいずれにおいても抗Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ型コラーゲン抗体は、腫瘍間質、周辺組織間質のあらゆるコラーゲン線維にそれぞれ反応した (図1)。

(2) 抗Ⅳ型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体の反応形態

a) 正常ヒト皮膚；

抗Ⅳ型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体共に、表皮真皮境界、血管、皮膚付属器周囲の基底膜に線状に反応した。また、基底膜近辺の間質に顆粒状に反応陽性物質が認められた。

b) 良性皮膚腫瘍 (SK)；

抗Ⅳ型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体ともに腫瘍細胞と間質の境界部に線状に陽性であった。腫瘍間質には特に抗Ⅳ型コラーゲン抗体陽性の顆粒状ないし細線維状の反応物質が多く認められた。一部に僅かながら基底膜の線状の陽性像に断裂が認められた (図2)。

c) BCE, BD, SCC；

Common BCE, BDとfibrosing BCE, SCCでは抗Ⅳ型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体の反応形態において各々異なる傾向が認められた。

c-1) Common BCE, BD；

抗Ⅳ型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体共に、腫瘍細胞と間質の境界部に大部分線状に反応した。抗Ⅳ型コラーゲン抗体陽性の部分で抗ラミニン抗体に反応しない部分も認められた。Common BCEにおいて抗Ⅳ型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体は腫瘍細胞巢内の一部の個々の腫瘍細胞の周囲にも反応した (図3)。

c-2) Fibrosing BCE, SCC；

Fibrosing BCEでは抗Ⅳ型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体の腫瘍細胞を取り囲む陽性像に

図 1. Basal cell epithelioma (BCE)

A : Hematoxylin&eosin 染色体

B : 抗I型コラーゲンポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法所見

C : 抗III型コラーゲンモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法所見

D : 抗V型コラーゲンポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法所見

図 2. Seborrheic keratosis

抗IV型コラーゲンポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法所見：腫瘍細胞巣と間質の境界部の線状の陽性像に断裂が見られる（矢印）

図 3. non-fibrosing basal cell epithelioma; 抗IV型コラーゲン抗体を用いた免疫電顕所見

断裂や欠損が多く認められた。SCCでは、stage II, III, IVのいずれにおいても断裂や欠損の著明な部分と肥厚、重層化の著明な部分があった。Fibrosing BCEの抗IV型コラーゲン抗体を用いた免疫電顕では腫瘍細胞巣と間質の境界部にbasal lamina様構造も反応陽性物質も認められなかった(図4)。SCCでは、抗IV型コラーゲン

抗体に反応している部分と反応しない部分の種々の像が認められた。

考 察

1) I, III, V型コラーゲンの分布と存在形態

図4. fibrosing basal cell epithelioma ; 抗IV型コラーゲン抗体を用いた免疫電顕所見

これまでBCE, BD, SCC, SKにおけるI, III, V型コラーゲンの局在は不明であったが、今回の結果より、悪性、良性を問わず間質の線維成分はI, III, V型コラーゲンのすべてを含むことが明らかとなった。このように何れかの成分のみが消失するという現象が認められなかった理由としては次の2つの可能性が挙げられる。

①腫瘍細胞由来のコラーゲナーゼは、I, III, V型コラーゲンのすべてを分解し得るため。

②腫瘍性に線維成分が新生される際にも正常皮膚と同様、I, III, V型のすべてのコラーゲンが生成されるため。

腫瘍細胞は未分化な細胞の性質を有しpluripotentialであることを考慮すると、上述のいずれの能力も有する可能性は高い。また症例によってはこれらの成分の一部が欠如する領域が出現する可能性は残されているといえる。

2) IV型コラーゲン、ラミニンの分布と存在形態

(1) BCE

BCEにおいては、これまでIV型コラーゲンは腫瘍細胞巢の周囲に連続的に陽性であるという報告¹¹⁾⁻¹⁵⁾とfibrosing BCEにおいてはIV型コラーゲンが腫瘍細胞の周囲で消失、減少しており、これらは悪性を示唆する所見であるという報告¹⁶⁾¹⁷⁾がある。これまでの報告はPAP法により検索したものやmouse EHS sarcomaのIV型コラーゲンに対する抗体を用いたものである。今

回の検索ではヒト胎盤由来のIV型コラーゲンに対するポリクローナル及びモノクローナル抗体の両方を用い、二次抗体としてaffinity purified F(ab')₂ fractionを使用し間接蛍光抗体法を行ったものであり、non-fibrosingおよびfibrosingの種々のBCEについて比較検討した結果であることから、より正確なものと考えられる。その結果、non-fibrosing typeのBCEにおいても腫瘍細胞巢の周囲を囲むIV型コラーゲンの線状の陽性像に断裂や欠損が認められること、しかしfibrosing type BCEにおいては断裂、欠損がより著明であることなどが明らかとなった。

また、BCEの腫瘍細胞巢の内部に斑状のIV型コラーゲン陽性物質が認められ、これを超微細形態学的に観察すると個々の腫瘍細胞の周囲を部分的あるいは全周を取り囲むようにIV型コラーゲンに反応した電子密な物質が認められた。このことから、個々の腫瘍細胞がIV型コラーゲンを合成したものと考えられた。

(2) BD, SCC

これまでのBD, SCCにおける基底膜成分の検索においては、BDではIV型コラーゲン、ラミニンは連続的に陽性である¹¹⁾¹⁵⁾¹⁸⁾⁻²⁰⁾のに対し、SCCではIV型コラーゲン、ラミニンの分布に断裂や欠損が多く認められ悪性を示す所見であるとする意見¹⁸⁾と、SCCにおいても基底膜成分の分布の異常はあるものの連続性は保たれており、断裂が必ずしも悪性を示唆するものではないとする意見¹⁹⁾がある。我々は症例の臨床経過やSCCの発生母地としての特徴、UICCの提唱するstage分類に基づく比較検討を行った。その結果、stageIIのSCCにおいてはIV型コラーゲン、ラミニンともに腫瘍細胞巢の周囲に連続的に陽性であるのに対し、stageIII, IVにおいては大きな欠損像や断裂、逆に重層化などの過形成といった分布異常が著明に認められることが明らかとなった。IV型コラーゲンの分布状態とラミニンのそれとは全く一致するわけではないが、IV型コラーゲンの欠損が著明な症例ではラミニンの分布も欠損、断裂を呈するというように両者

はほぼ並行関係にあった。

Stage分類以外のSCCの予後に影響するとされる要素については、発生部位、発生母地としての皮膚障害の種類などがあるが、転移率が高いとされる下口唇に生じた例や熱傷瘢痕上に生じた例において特に他の例と異なる特異な所見は認められなかった。

(3) 悪性腫瘍と良性腫瘍の比較

各種上皮性皮膚腫瘍と正常皮膚のⅣ型コラーゲンの存在形態における差異を表にまとめた(表1)。基底膜の存在形態における異常な所見

表1

Staining patterns with anti-type IV collagen antibody

	defect of basement membrane	excess in the interstitium	freckle in the tumor nest
normal skin	—	±~+	—
BCE nonfibrosing type	—~±	±~+	—~±
fibrosing type	±	±~+	—~±
seborrheic keratosis	—~±	±~±	—
Bowen's disease	—	±~±	—~±
SCC stage I	±~±	±~±	—~±
stage II	±	±~±	±
stage III	±~±	±	—~+

— not recognized at all
± rarely recognized
+ moderately recognized
± much recognized
± extremely recognized

として基底膜部の断裂および欠損像、間質の顆粒状ないし線維状陽性像、腫瘍細胞巢内の斑状陽性像の3種に分類される。症例により所見の存在の程度は多様であるが、臨床的により悪性であるとされるfibrosing BCE, SCCの方が異常所見は多く認められる傾向がある。3種の異常所見は良性の腫瘍においても認められることがあり、必ずしも悪性を示すものではないが、異常所見の出現頻度は腫瘍の悪性度と正の相関を示すといえる。従って、抗Ⅳ型コラーゲン抗体、抗ラミニン抗体を用いることによって腫瘍の予後判定に役立つ情報が得られると考えられる。

文 献

- Orr, J. W.: The changes antecedent to tumour formation during the treatment of mouse skin with carcinogenic hydrocarbons. *J. Pathol. Bacteriol.*, **46**: 495-515, 1938.
- Ma, C. K.: Morphological and chemical investigation of dermal elastic, and collagenic tissue during epidermal carcinogenesis. *Cancer Res.*, **9**: 481-487, 1949.
- Billingham, R. E., Orr, J. W. and Woodhouse, D. L.: Transplantation of skin components during chemical carcinogenesis with 20-methylcholanthrene. *Br. J. Cancer.*, **5**: 417-432, 1951.
- Miller, E. J. and Rhodes, R. K.: Preparation and characterization of the different types of collagens. *Methods Enzymol.*, **82**: 33-64, 1982.
- Burgeson, R. E., El Adli, F. A., Kaitila, I. I. and Hollister, D. W.: Fetal membrane collagens: Identification of two new collagen alpha chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**: 2579-2583, 1976.
- Furuto, D. K. and Miller, E. J.: Isolation of a unique collagenous fraction from limited pepsin digests of human placental tissue: Characterization of one of the constituent polypeptide chains. *J. Biol. Chem.*, **255**: 290-295, 1980.
- 深井和吉, 石井正光, 小林裕美, 茶之木美也子, 濱田稔夫, 村垣泰光, 大島 章: 正常ヒト皮膚におけるⅠ型およびⅢ型コラーゲンの分布: モノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いた免疫組織学的検索. *西日皮膚*, **48**: 915-919, 1986.
- 小林裕美, 石井正光, 茶之木美也子, 深井和吉, 濱田稔夫, 村垣泰光, 大島 章: 正常ヒト皮膚におけるⅣ型コラーゲンの基底膜外分布: 抗ヒトⅣ型コラーゲン抗体を用いた免疫組織学的検索. *西日皮膚*, **48**: 920-923, 1986.
- 茶之木美也子, 石井正光, 深井和吉, 小林裕美, 濱田稔夫, 村垣泰光, 大島 章: 正常ヒト皮膚におけるⅤ型コラーゲンの分布: $[\alpha_1(V)]_2\alpha_2(V)$ コラーゲンに対する抗体を用いた間接蛍光抗体法. *西日皮膚*, **48**: 924-928, 1986.
- Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495-497, 1975.
- van Cauwenberge, D., Pierard, G. E., Foidart, J. M. and Lapiere, Ch. M.: Immunohistochemical localization of laminin, type IV and type V collagen in basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, **108**: 163-170, 1983.
- Weber, L., Krieg, T., Muller, P. K., Kirsch, E.

- and Timpl, R.: Immunofluorescent localization of type IV collagen and laminin in human skin and its application in junctional zone pathology. *Br. J. Dermatol.*, **106**: 267-273, 1982
- 13) Stanley, J. R., Beckwith, J. B., Fuller, R. P. and Katz, S. I.: A specific antigenic defect of the basement membrane is found in basal cell carcinoma but not in other epidermal tumors. *Cancer*, **50**: 1486-1490, 1982.
- 14) McArdle, J. P., Roff, B. T. and Muller, H. K.: Characterization of retraction spaces in basal cell carcinoma using an antibody to type IV collagen. *Histopathol.*, **8**: 447-455, 1984.
- 15) Cam, Y., Bellon, G., Poulin, G., Caron, Y. and Birembaut, P.: Distribution of type IV collagen in benign and malignant epithelial proliferations: An indirect immunofluorescence study on the breasts, the lung, and the skin. *Invasion Meta.*, **4**: 61-72, 1984.
- 16) Kallioinen, M., Autio-Harminen, H., Dammert, K., Risteli, J. and Risteli, L.: Discontinuity of the basement membrane in fibrosing basocellular carcinomas and basosquamous carcinomas of the skin: An immunohistochemical study with human laminin and type IV collagen antibodies. *J. Invest. Dermatol.*, **82**: 248-251, 1984.
- 17) Barsky, S. H., Grossman, D.A. and Bhuta, S.: Desmoplastic basal cell carcinomas possess unique basement membrane-degrading properties. *J. Invest. Dermatol.*, **88**: 324-329, 1987.
- 18) Barsky, S. H., Siegel, G. P., Jannotta, F. and Liotta, L.A.: Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab. Invest.*, **49**: 140-147, 1983.
- 19) Gusterson, B. A., Warburton, M. J., Mitchell, D., Kraft, N. and Hancock, W. W.: Invading squamous cell carcinoma can retain a basal lamina; An immunohistochemical study using a monoclonal antibody to type IV collagen. *Lab. Invest.*, **51**: 82-87, 1984
- 20) Gusterson, B. A., Clinton, S. and Gough, G.: Studies of early invasive and intraepithelial squamous cell carcinomas using an antibody to type IV collagen. *Histopathol.*, **10**: 161-169, 1986.