

[原 著]

口腔扁平上皮癌，とくに舌癌における
Ulex europeus I レクチンの検討

賀来 亨, 館山 美樹, 奥山 富三,
岩井 正行*, 山本 悦秀*, 有坂 一男**,
新保 亮一**, 鏑原 茂**

東日本学園大学歯学部口腔病理学講座
*札幌医科大学口腔外科学講座
**岩手医科大学歯学部口腔病理学講座

(主任: 奥山 富三 教授)
*(主任: 小浜 源郁 教授)
**(主任: 鈴木 鍾美 教授)

Study on Ulex europeus I Lectin Binding in Oral
Squamous Cell Carcinomas, Particularly
Lingual Carcinomas

Tohru KAKU, Miki TATEYAMA, Tomizo OKUYAMA,
Masayuki IWAI*, Etsuhide YAMAMOTO*, Kazuo ARISAKA**,
Ryoh-ichi SHIMPO**, and Shigeru TSUBAHARA**

Department of Oral Pathology, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

*Department of Oral Surgery,
SAPPORO MEDICAL COLLEGE

**Department of Oral Pathology, School of Dentistry,
IWATE MEDICAL UNIVERSITY

(Chief: Prof. Tomizo OKUYAMA)
*(Chief: Prof. Gen-iku KOHAMA)
**(Chief: Prof. Atsumi SUZUKI)

Abstract

The distribution of Ulex europeus agglutinin (UEA-I) lectin binding sites in squamous cell carcinomas of the tongue was studied. The UEA-I lectin binding sites were revealed using the immunoperoxidase method. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were employed.

The cell membranes of the spinous layer stained positively in normal lingual mucosa, whereas the basal cells reacted negatively. The UEA-I binding sites were present in

受付: 昭和59年3月31日

本論文の要旨は東日本学園大学歯学会第2回学術大会(昭和59年1月)において発表した。

all of the squamous cell carcinomas of the tongue. The staining intensity in cancerous lesions showed a considerable variation. The staining intensities in poorly differentiated squamous cell carcinomas were weaker than in moderately and well differentiated squamous cell carcinomas. The localization of UEA-I binding was on the cell membranes and also in the cytoplasm of the poorly differentiated squamous cell carcinomas. Moderately and well differentiated squamous cell carcinomas showed more intense staining and localization of UEA-I binding on the cell membranes.

The present study suggests that the staining intensities of UEA-I lectin binding tend to correlate with the degree of differentiation of squamous cell carcinomas.

Key words : Ulex europeus agglutinin I, lectin, lingual carcinoma, squamous cell carcinoma, immunohistochemistry

緒 言

細胞表面の複合糖質は、細胞増殖、発生、分化、細胞接着、細胞間認識などの細胞機能に重要な役割を担っていることが知られている。¹⁻³⁾ レクチンは種々の糖を認識して、特異的に結合する性質を有するため、近年、種々の組織における糖蛋白や糖脂質の分布を調べる手段として用いられている。⁴⁻¹⁰⁾

ハリエニシダに由来する Ulex europeus agglutinin I (UEA-I) レクチンはL-フコースに特異性をもち、血液型 H (O) 物質のマーカーとして使われてきた。^{11,12)} UEA-I レクチンは必ずしも O 型赤血球のみを凝集するのではなく、程度の差はあるが、他の型の赤血球をも凝集する能力を有している。^{11,12)} 血液型物質 A, B は血液型 H 物質特異性をもっている前駆物質に糖を加えることによって合成され、A, B 型赤血球には H 型抗原性を持った糖鎖が残っており、これらの糖鎖が UEA-I レクチンとの結合に関与している。^{11,12)} 口腔前癌病変、癌病変における UEA-I 結合性血液型 H 物質の局在を A, B 型抗原とあわせて、血液型物質という観点からの報告がなされているが、¹³⁻¹⁹⁾ 最近、悪性変化に際しておこる複合糖質の糖鎖の変化が注目されてい

る。²⁰⁾ 食道粘膜上皮、口腔粘膜上皮の異型上皮、上皮内癌に関する基準を UEA-I の結合性を用い、酵素抗体法で検索を行い、UEA-I の染色態度が正常と異なることを見出し、食道、口腔粘膜上皮の癌化の初期像を認定するうえで有力な方法であると報告している。^{20,21)} われわれは口腔前癌病変、癌病変の若干の症例を UEA-I を用いて、UEA-I 結合性を酵素抗体法により検索を行い、同様の結果をすでに報告している。²²⁾

今回、とくに舌癌症例について、酵素抗体法により、UEA-I の染色性の強さと、癌の分化度と相関関係が認められるかどうかについて検索を行った。

材料ならびに方法

検索材料は舌癌 (扁平上皮癌) 34 例である。免疫組織化学的検索は Sternberger ら²³⁾ の PAP 法に準じて行った。²²⁾ 概略を記すと、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織標本を用いて行った。標本を 5 μ に薄切し、脱パラフィンを行い、アルコールを通し、水洗した後、10% 正常ウサギ血清で 0.004 mg/ml の濃度に希釈した Ulex europeus agglutinin I (UEA-I) レクチンを反応させた後、非特異的 background staining を減弱させる目的で、正常ウサギ血清を用い、次

に抗 UEA-I 抗体ヤギ血清 (1:1000), 抗ヤギ免疫グロブリン・ウサギ血清 (1:20) を反応させ, peroxidase antiperoxidase complex (1:50) との反応を行い, Graham and Karnovsky²⁴⁾ の方法に準じて, 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) 50mg/100ml にて茶かっ色に反応させ, Bioleit 封入を行い, 鏡検した。核染色はヘマトキシリンを用いた。

PAP 法の陰性対照は以下の通りである。

1) UEA-I は α -L-fucose に特異性を有するので, UEA-I のかわりに, UEA-I, 0.2 M α -L-fucose 混合液を反応させ, 以下同様の方法を行った。2) 抗 UEA-I 抗体・ヤギ血清のかわりに, 正常ヤギ血清を用いた。陽性対照としては, UEA-I は症例の組織切片の中に存在する赤血球, 血管内皮細胞に局在が認められる。組織学的検索はヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

結 果

正常口腔粘膜上皮では UEA-I 結合部位は棘細胞層の細胞で陽性で, 基底細胞層および角化層には認められなかった。赤血球, 血管内皮細胞で陽性で, 一方, 結合織, 筋線維は陰性であった。UEA-I のかわりに α -L-fucose (0.2 M) と UEA-I の混合液では UEA-I の特異的染色は認められなかった。

扁平上皮癌では, UEA-I 結合の局在は全症例に陽性であったが, 多くの症例では部分的に局在が認められた。染色の強さは Table 1 に示す如く, 様々で, 癌の分化度と染色性の強さに相関関係が認められた。

低分化型扁平上皮癌 (Figs. 1, 2) では, 染色性の強さは, 強陽性を示す症例も認められるが (Table 1), 全体的に弱く, 細胞膜のみならず, 細胞質内に染色性が認められた。中分化型 (Figs. 3, 4), 高分化型扁平上皮癌 (Figs. 5, 6) では, 染色性の強さはほぼ同様の所見を示し, 強陽性ないし, 中等度陽性を示す症例が多く

(Table 1), UEA-I 結合の局在は網目状に細胞膜に認められた。個々の症例について, 説明すると, Fig. 1 は低分化型扁平上皮癌の症例で, UEA-I の染色性は弱く, 細胞膜の染色性は弱く, 細胞質に染色性が認められた。Fig. 2 は Fig. 1 と同症例で, 深部浸潤を示した部分であるが, 血管内皮細胞には染色性が認められたが, 癌胞巢には UEA-I の結合は認められなかった (Fig. 2 B)。Figs. 3, 4 は中分化型扁平上皮癌の組織像で, Fig. 3 は癌細胞が粘膜下に浸潤している組織を示し, UEA-I 結合は被覆している正常口腔粘膜上皮では, 基底細胞層に陰性で, 棘細胞層に強陽性を示し, 癌組織では部分的に癌細胞に陽性を示している。Fig. 4 は深部浸潤部位の Fig. 3 と同一症例の癌組織で, UEA-I の結合は癌真珠周囲に強陽性を示し, 間質に接する基底細胞に相当する細胞で陰性を示し, UEA-I 結合様式は網目状に細胞膜に認められた。Figs. 5, 6 は高分化型扁平上皮癌の症例で, UEA-I の染色性の強さは様々で, 細胞質の豊かな, 細胞境界明瞭な癌組織に強い染色性を示し, 結合様式は細胞膜に認められた。光顕レベルでは, UEA-I 結合部位は低分化型扁平上皮癌では, 細胞膜および細胞質に認められ, 中分化型, 高分化型扁平上皮癌では, 多くの症例で, 細胞膜に強い結合性が認められる傾向があった。

Table 1 Relationship between differentiation and UEA-I binding on lingual carcinomas

Squamous cell carcinoma	Cases	UEA-I				
		+++	++	+	±	-
poorly differentiated	10	2	1	1	6	0
moderately differentiated	12	4	5	1	2	0
well differentiated	12	4	2	4	2	0
	34	10	8	6	10	0

Staining intensities are scored from (-) negative to +++ (intensely positive).

考 察

細胞が悪性化するときに起こる変化が長年注目され、一般的に細胞表面抗原や、とくに血液型物質に強い関心がよせられている。最近、種々のレクチンを用いて、細胞表面の複合糖質の糖鎖の変化という観点から細胞の悪性化の検索の報告がなされている。^{7,10,19,25-29)}

レクチンは膜を構成する糖蛋白成分の糖残基に結合する Carbohydrate-binding protein であり、動物および植物中に広く分布している。^{3,12)} 現在、糖特異性や化学的性質が明らかになった多くのレクチンがある。^{1-3,12)} レクチンを用いた研究は従来血球や培養細胞などを中心に行われ、^{3,12)} ヒト口腔粘膜上皮を材料とした報告は少い。^{19,20,22,25,29,30)}

本論文に用いた UEA-I レクチンは L-フコースに特異性を有し、 α -L-フコース残基を含むオリゴ糖により血球凝集阻止を受ける。このレクチンは血液型 H 物質のマーカーとして使われており、¹²⁾ 血液 A, B 抗原とあわせて口腔粘膜での分布をみた報告がある。^{17,18)} A 型, B 型赤血球には H 型抗原性をもった糖鎖が残っており、これらの糖鎖が UEA-I レクチンとの結合に関与する。^{11,12)}

血液型 H 物質は血液型 A, B の前駆物質と考えられており、^{12,31,32)} 血液型 A, B 物質より、口腔粘膜上皮の分化において早期に出現するようである。³³⁾ 従来の報告では、血液型 H 物質の検索において、口腔前癌病変、癌病変において血液型物質の局在は多くの症例において認められなかった。¹³⁻²⁰⁾ 佐藤ら²¹⁾ は食道の異型上皮、上皮内癌について UEA-I 結合性血液型 H 物質を PAP 法で検討した結果、異型上皮、上皮内癌の基底細胞が陽性を示す傾向があり、また、食道の癌化の初期像を認定するうえで、有力な方法であると報告している。また、口腔の前癌病変、上皮内癌でも同様の結果が報告されている。^{20,22)}

血液型 A 患者において、正常口腔粘膜上皮で

は下部有棘細胞層に血液型 A 物質の局在が認められるが、口腔前癌病変では血液型 A 物質の消失があり、同時に血液型 H 物質の検索を行うと、前癌病変では、上皮全層に認められ、H 抗原から A 抗原に変換するところの酵素活性が前癌病変で減少している。すなわち、H 物質の蓄積により、H 物質が染色されると Dabelsteen ら¹⁹⁾ は推測している。

角化傾向に乏しい、細胞間橋不明瞭な、癌真珠がほとんど認められない、核および細胞の多形性の著しい低分化型扁平上皮癌 (Figs. 1, 2) では UEA-I 結合による染色性は乏しく、角化傾向の認められる、比較的細胞間橋のはっきりした中分化型扁平上皮癌 (Figs. 3, 4)、癌真珠の多い、細胞間橋明瞭な、好酸性の豊かな細胞質をもつ高分化型扁平上皮癌で (Figs. 5, 6)、UEA-I の染色性が細胞膜につよく認められ、癌の分化度と UEA-I 結合性に相関関係が認められた (Table 1)。また、UEA-I レクチン結合のパターンが異型上皮や扁平上皮癌において、正常口腔粘膜上皮と比較すると不規則な、異ったパターンを呈していると思われる²²⁾ (Figs. 1~6)。朔³⁴⁾ は舌癌の WHO 分類に基く検索を行い、grade が進むに従って、予後不良となると報告している。われわれは患者の予後の検索は行っていないが、朔³⁴⁾ の結果は興味ある結果であり、UEA-I 結合性の保持が予後に関する因子となるかどうか、今後残された問題である。Dabelsteen ら¹⁹⁾ は血液型 A 患者の前癌病変 5 症例で、血液型 A 抗原の消失 4 症例に、血液型 H 抗原が観察されたと報告している。血液型 H 物質は血液型 A, B 物質の前駆物質と考えられており、血液型 A, B 物質より、口腔粘膜上皮の分化において早期に出現するという報告があり、³³⁾ 血液型 A, B 患者の口腔扁平上皮癌では、A, B 抗原の消失が認められても、A, B 抗原の前駆物質である H 抗原の保持の有無が予後に関係するかもしれない。

結 論

今回、舌癌34症例について、UEA-Iを用いて、酵素抗体法により、UEA-I結合性の検索を行い、UEA-Iの染色性の強さと癌の分化度と相関関係が認められるかどうかの検索を行った。34症例全例にUEA-I結合の局在が認められた。低分化型扁平上皮癌では染色性の強さは強陽性を示す症例も認められたが、全体的に弱く、細胞膜のみならず、細胞質に染色性が認められた。中分化型、高分化型扁平上皮癌では強陽性ないし、中等度陽性を示す症例が多く、局在は細胞膜に認められた。

UEA-Iの染色性の強さと癌の分化度と相関関係が認められた。

参 考 文 献

1. 平野 寛：細胞表面の糖鎖と細胞認識，代謝，14；1743-1754，1977.
2. 村松 喬：細胞分化と糖蛋白質，医学のあゆみ，121；467-477，1982.
3. 箱守仙一郎：細胞表面複合糖質と細胞認識．細胞認識と動物レクチン，大沢利昭編，1-28，講談社サイエンティフィック，東京，1982.
4. Holt, P. J. A., Anglin, J. H. Jr., and Nordquist, R. E. : Localization of specific carbohydrate configuration in human skin using fluorescein-labelled lectins, *Br. J. Dermatol.*, 100 ; 237-245, 1979.
5. Brabec, R. K., Peters, B. P., Bernstein, I. A., Gray, R. H., and Goldstein, I. J. : Differential lectin binding to cellular membranes in the epidermis of the newborn rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77 ; 477-479, 1980.
6. Hsu, S-M., and Raine, L. : Versatility of biotin-labeled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections, *J. Histochem. Cytochem.*, 30 ; 157-161, 1982.
7. Cooper, H. S. : Peanut lectin-binding sites in large bowel carcinoma, *Lab. Invest.*, 47 ; 383-390, 1982.
8. Wu, T-C., Wan, Y-J., and Damjanov. I. : Distribution of *Bandeiraea simplicifolia* lectin binding sites in the genital organs of female and male mice, *Histochemistry*, 77 ; 233-241, 1983.
9. Ookusa, Y., Takata, K., Nagashima, M., and Hirano, H. : Distribution of glycoconjugates in normal human skin using biotinyl lectins and avidin-horseradish peroxidase, *Histochemistry*, 79 ; 1-7, 1983.
10. 宇野明彦，堀 嘉昭，齊田俊明，関 利仁，大原国章，久木田淳，平野 寛：ヒト正常皮膚及び悪性腫瘍におけるレクチン結合部位，日皮会誌，93；1021-1026，1983.
11. 木幡 陽：血液型の生化学，蛋白質核酸酵素，18；83-92，1973.
12. 辻 勉，大沢利昭：レクチンとその糖結合特異性，蛋白質核酸酵素，28；118-131，1983.
13. Dabelsteen, E., and Fulling, H. : A preliminary study of blood group substances A and B in oral epithelium exhibiting atypia, *Scand. J. Dent. Res.*, 79 ; 387-393, 1971.
14. Dabelsteen, E. and Pindborg. J. J. : Loss of epithelial blood group substance A in oral carcinomas, *Acta path. microbial. scand. Section A*, 81 ; 435-444, 1973.
15. Liu, J. G., Dunlap, C. L., Jinks, W. L., Lin, F., Przybylski, C. and Miller, L. A. : Carcinoma of the oral cavity evaluation by specific red cell adherence test, *Oral Surg.*, 38 ; 56-64, 1974.
16. Dabelsteen, E., Roed-Petersen, B. and Pindborg, J. J. : Loss of epithelial blood group antigens A and B in oral premalignant lesions, *Acta path. microbial. scand. Section A*, 83 ; 292-300, 1975.
17. Stejskal, R., Lill, P. H., Mlsna, J. and Davidsohn, I. : A, B and H isoantigens in atypical oral epithelium, *Cancer Immunol. Immunother.*, 3 ; 195-199, 1978.
18. George, D. I., Burzynski, N. J. and Miller, R. L. : Reactive properties of oral lesions to the specific red cell adherence test, *Oral Surg.*, 47 ; 51-57, 1979.
19. Dabelsteen, E., Vedtofte, P., Hakomori, S., and Young, W.W.Jr. : Accumulation of a blood group

- antigen precursor in oral premalignant lesions, *Cancer Res.*, 43 ; 1451-1454, 1983.
20. 朔 敬, 岡辺治男: UEA-I および BSA-I レクチンによる口腔粘膜前癌病変, 扁平上皮癌の検索, 歯基礎誌25 (Supplement) ; 171, 1983.
 21. 佐藤栄一, 丸田憲三, 米沢 傑, 中村敬夫, 清水健: 食道上皮内血液型H物質の検討—異型上皮と癌における所見—, 日病会誌, 72 ; 271-272, 1983.
 22. 賀来 亨, 館山美樹, 奥山富三, 岩井正行, 鏑原 茂, 有坂一夫, 新保亮一: 口腔前癌病変, 扁平上皮癌における血液型H物質の検討 (予報), 東日本歯誌 2 ; 143-155, 1983.
 23. Sternberger, L. A., Hardy, P. H. Jr., Cuculis, J. J. and Meyer, H. J. : The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry ; Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes, *J. Histochem. Cytochem.*, 18 ; 315-333, 1970.
 24. Graham, R. C, Jr. and Karnovsky, M. T. : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique, *J. Histochem. Cytochem.*, 14 ; 291-302, 1966.
 25. Dabelsteen, E., Mackenzie, I. C. : Expression of *Ricinus communis* receptors on epithelial cells in oral carcinomas and oral wounds, *Cancer Res.*, 38 ; 4676-4680, 1978.
 26. Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S., and Sato, E. : Glycoconjugated with *Ulex europaeus* agglutinin-I-binding sites in normal mucosa, adenoma, and carcinoma of human large bowel, *JNCI*, 69 ; 777-785, 1982.
 27. Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S., Murata, K., Nishi, M., and Sato, E. : 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.
 28. Cooper, H. S. and Reuter, V. E. : Peanut lectin-binding sites in polyps of the colon and rectum : Adenomas, hyperplastic polyps and adenomas with in situ carcinoma, *Lab. Invest.*, 49 ; 655-661, 1983.
 29. Hyum, K-H., Nakai, M., Kawamura, K., and Mori, M. : Histochemical studies of lectin binding patterns in keratinized lesions, including malignancy, *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 402 ; 337-351, 1984.
 30. Dabelsteen, E., Fejerskov, O., Norén, O., and Mackenzie, I. C. : Concanvalin A and *Ricinus communis* receptor sites in normal human oral mucosa, *J. Invest. Dermatol.*, 70 ; 11-15, 1978.
 31. Watkins, W.M. : Blood-group substances. In the ABO system the genes control the arrangement of sugar residues that determines blood-group specificity, *Science*, 152 ; 172-181, 1966.
 32. Lill, P. H., Stejskal, R., and Mlsna, J. : Distribution of H antigen in persons of blood groups A, B, and AB, *Vox Sang.*, 36 ; 159-165, 1979.
 33. Vedtofte, P. and Matthiessen, M. E. : Distribution of blood group antigens A, B and H in human fetal oral mucosal and odontogenic epithelium, *Scand. J. Dent. Res.*, 89 ; 463-474, 1981.
 34. 朔 敬: 舌扁平上皮癌の予後因子の検討—組織像ならびに核 DNA 量を中心として—, 日口外誌, 26 ; 279-294, 1980.

Explanation of Figures

Fig. 1 Poorly differentiated squamous cell carcinoma.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 112.

B. Immunoperoxidase staining of the neighboring section shown in Fig. 1A for UEA-I binding site.

Positive reaction was shown focally in the cancerous lesion (arrow). Positive reaction in vascular endothelia serves as a built-in control (arrow head).

Positive reaction was localized in cell membranes and also in cytoplasm of tumor cells.

Counterstain with hematoxylin. Magnification X 112.

Fig. 2 Infiltrating lesion of poorly differentiated squamous cell carcinoma from the patient shown in Fig. 1.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 112.

B. Immunoperoxidase staining of the neighboring section shown in Fig. 2 A for UEA-I binding site.

The cancerous lesion showed negative (arrow). Positive reaction was shown in vascular endothelium (arrow head) Counterstain with hematoxylin. Magnification X 112.

Fig. 3 Moderately differentiated squamous cell carcinoma extending beneath the normal squamous epithelium.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 112.

B. Immunoperoxidase staining of the neighboring section shown in Fig. 3 A for UEA-I binding site.

Normal mucosa showed positive reaction except for basal cell layer. Cancerous lesions revealed positive reaction. Counterstain with hematoxylin. Magnification X 112.

Fig. 4 Infiltrating lesion of moderately differentiated squamous cell carcinoma from the patient shown in Fig. 3.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 112.

B. Immunoperoxidase staining of the neighboring section shown in Fig. 4 A for UEA-I binding site.

Cancerous lesions revealed positive reaction around the cancer pearls. Cell membranes of individual tumor cells are clearly defined. Counterstain with hematoxylin. Magnification X 112.

Fig. 5 Well differentiated squamous cell carcinoma.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 45.

B. Immunoperoxidase staining of the neighboring section shown in Fig. 5 A for UEA-I binding site.

Focally strong reaction was shown in cancerous lesions. Positive reaction was shown in vascular endothelia of capillaries and small vessels (arrow head). Counterstain with hematoxylin. Magnification X 45.

Fig. 6 Well differentiated squamous cell carcinoma.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 112.

B. Immunoperoxidase staining of the neighboring section shown in Fig. 6 A for UEA-I binding site.

Strong positive reaction was shown in cancerous lesions. Cell membranes of individual tumor cells are clearly defined. Endothelia of arterial blood vessels showed positive reaction (arrow head). Counterstain with hematoxylin. Magnification X 112.







