

[原 著]

口腔扁平上皮癌における Epithelial Membrane Antigen の局在に関する免疫組織化学的研究

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

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)

Immunohistochemical Study on the Localization of Epithelial Membrane Antigen in Oral Squamous Cell Carcinomas

Tohru KAKU, Miki TATEYAMA, Tomizo OKUYAMA,
Masayuki IWAI*, Ryo-ichi SHIMPO,** Shigeru TSUBAHARA,**
Kazuo ARISAKA**

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

Forty-two cases of oral squamous cell carcinomas were studied by the immunoperoxidase technique (avidin-biotin peroxidase complex method) to determine the presence of Epithelial Membrane Antigen (EMA) using an EMA monoclonal antibody. The tissues employed were formalin-fixed and paraffin-embedded.

31 out of 42 squamous cell carcinomas showed positive reaction in the presence of EMA. In most of the cases staining was patchy. There was a tendency for EMA to be present in the better differentiated zones and there was a definite correlation with the degree of differentiation of squamous cell carcinomas.

Normal squamous epithelium showed negative for EMA. Nondysplastic squamous epithelium adjacent to positive squamous cell carcinoma frequently showed positive staining, which however was confined to the superficial layers. Dysplastic epithelium showed staining confined to the superficial layer and cytoplasmic staining was also weaker.

It was confirmed by evidence in the present report that EMA is a valuable marker for the initial change of malignant transformation in oral mucosa.

Key words : Immunohistochemistry, Epithelial Membrane Antigen, oral squamous cell carcinoma

緒 言

乳汁の主成分たる脂肪は、細胞質中の滑面小胞体中に小滴として形成され、次第に上部へ移動しながら成長し、2—5 μ の脂肪滴となって、細胞上端にアポクリン突起をなして凸出する。この突起がくびれて、離断することにより、少量の細胞質に包まれたまま、腺腔へ放出される¹⁾。これが乳球である。この乳球膜に対する抗体が作製され、多くの腺上皮の腺腔面細胞膜の成分と特異的に反応を示した²⁾。この成分は Epithelial Membrane Antigen (EMA) と名づけられた^{3,3)}。正常組織では重層扁平上皮、腎の近位尿細管上皮、肝細胞以外の上皮性組織に EMA の局在が認められ、その局在部位は腺腔面および表面細胞膜に限局して認められ、基底膜および隣接細胞膜には局在が認められない³⁾。重層扁平上皮組織では炎症性病変でしばしば EMA 酵素抗体法により、強い染色性が認められ、扁平上皮癌では大部分の症例に染色性が認められている^{3,5)}。腫瘍組織では大部分の上皮性悪性腫瘍に強い染色性が認められ、上皮性、非上皮性悪性腫瘍の鑑別診断の一つの補助手段として非常に有効である^{3,6,7)}。

免疫組織化学的方法を用いた扁平上皮癌に関する EMA 検索の報告は少く^{3,5)}。今回、われわれは EMA モノクローナル抗体を用いて、口腔扁平上皮癌における EMA の分布を酵素抗体法である Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 法⁸⁾によって検索を行った。

材料ならびに方法

検索材料は口腔扁平上皮癌42例、他病変のために切除された組織に付随した正常口腔粘膜上皮および癌組織に付随する非癌部粘膜上皮である。免疫組織化学的検索は Hsu ら⁸⁾の ABC 法に順じて、Table 1 の方法により行った。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 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、非特異的 background staining を減弱させる目的で 10% 正常馬血清を用い、次に EMA モノクローナル抗体 (1:50)、Biotin 化抗マウス免疫グロブリン・ウマ血清 (1:100)、Avidin-Biotin Peroxidase Complex を反応させ、Graham and Karnovsky の方法⁹⁾に順じて、3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) 50mg/100ml にて茶かっ色に反応させ、Bioleit 封入を行い、

Table 1 ABC immunoperoxidase staining procedure for the detection of EMA

Step 1. Deparaffinize and hydrate tissue sections through xylene and graded alcohol series.
Step 2. Rinse for 5 minutes in distilled water.
Step 3. Wash in phosphate buffered saline (PBS) for several minutes.
Step 4. Incubate sections with 10% normal horse serum in PBS for 10 minutes.
Step 5. Blot excess serum from sections.
Step 6. Incubate sections with EMA monoclonal antibody* at a dilution 1:50 overnight in a moist chamber at 4°C.
Step 7. Wash slides for 15 minutes in buffer.
Step 8. Incubate sections for 30 minutes with biotinylated anti-mouse IgG horse serum** diluted 1:100.
Step 9. Wash slides for 15 minutes in buffer.
Step 10. Incubate sections for 60 minutes with ABC Reagent**.
Step 11. Wash slides for 15 minutes in buffer.
Step 12. Incubate sections for 2 minutes in peroxidase substrate solution.
Step 13. Wash sections for 15 minutes in tap water.
Step 14. Counterstain, clean and mount.
* Dakopatts A/S, Copenhagen, Denmark
** Vector Laboratories, Burlingame, California, U. S. A.

鏡検した。核染色はヘマトキシリンを用いた。

EMA 染色の陽性対照として乳癌組織を用い、陰性対照として、非免疫マウス血清を一次抗体として使用した。

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 EMA の局在は認められず、軽度の異型を示す上皮で陽性所見が認められた (Fig. 1)。また EMA の陽性所見を示した癌組織に近接した異型性のない重層扁平上皮にしばしば EMA の局在が上皮の表層に認められた (Fig. 2)。扁平上皮癌では42例中31例 (74%) に EMA の陽性所見が認められ、組織分化度との関係は、低分化型扁平上皮癌15例中8例 (53%) (Fig. 3)、中分化型扁平上皮癌22例中18例 (82%) (Fig. 5, 6)、高分化型扁平上皮癌5例中5例 (100%) に EMA の局在が認められ、中分化型、高分化型扁平上皮癌に陽性例が多く認められた (Table 2)。陽性例の多くの症例で、EMA の局在は部分的で、細胞膜の染色

Table 2. Relationship between differentiation and EMA-positivity in oral squamous cell carcinomas

Squamous cell carcinoma	Cases	Positive	Negative
poorly differentiated	15	8	7
moderately differentiated	22	18	4
well differentiated	5	5	0
	42	31	11

性は全周性 (Fig. 3 B, 5 B) あるいは表層細胞膜 (Fig. 6 B) に認められ、局在も分化傾向の示す部分につよい染色性を示した (Fig. 3 B, 5 B)。染色性の強さも症例により中等度ないし、強陽性を示す症例が認められたが、検索した症例の多くは弱い染色性を示し、染色範囲も広範囲でなかった。

考 察

EMA は上皮、中皮組織やこれらから生ずる腫瘍性組織に広く分布している。^{2-8,11,12} 上皮性腫瘍と非上皮性腫瘍^{3,6,7} 扁平上皮癌と基底細胞癌⁴、肝細胞癌と胆管癌¹¹ などの腫瘍病変の組織発生の鑑別やリンパ節などの微小転移巢の有無の検

索に有用であると報告されている^{12,13)}

Sloane ら⁴⁾はポリクローナル抗体を用い、種々の部位の正常重層扁平上皮および扁平上皮癌における EMA の分布の検索を行い、口咽頭(6例)、喉頭(6例)、子宮頸部(6例)、皮膚(6例)の正常重層扁平上皮で全例陰性、上皮内癌の検索では子宮頸部10例中10例、喉頭気管支3例中3例、皮膚4例中3例に陽性、浸潤癌では44例中34例(80%)に陽性で、その内訳は皮膚癌10例中9例、気管支癌5例中5例、子宮頸癌3例中3例、喉頭癌8例中4例、口腔癌18例中15例(83%)に陽性を示した。さらに EMA は低分化型扁平上皮癌より高分化型扁平上皮癌に広範囲に陽性所見を示し、低分化型扁平上皮癌では部分的に陽性所見が認められる傾向があり、また癌胞巢内でもより分化傾向を示す部分に EMA の局在する傾向がある⁴⁾と報告している。

Bamford ら⁵⁾は子宮頸部上皮の非腫瘍性上皮および腫瘍性病変を用いて、EMA, carcinoembryonic antigen (CEA), prekeratin の局在の検索を行い、非腫瘍性上皮21例中4例(20%)、上皮内癌25例中25例(100%)、浸潤癌16例中16例(100%)に EMA の局在が認められ、CEA の検索では上皮内癌23例中19例(83%)、浸潤癌7例中6例(86%)に陽性を示し、EMA と CEA を比較すると、EMA の陽性率が高く、悪性化の信頼しうるマーカーであると報告している。われわれは EMA モノクローナル抗体を用い、口腔扁平上皮癌の EMA の分布を ABC 法⁹⁾により検索し、42例中31例(74%)に EMA の局在が認められ、中分化型、高分化型扁平上皮癌に陽性例が多くみられた(Table 2)。異型上皮(Fig. 1)および癌組織に近接した異型性の認められない上皮(Fig. 2)にしばしば EMA の局在が認められた。また扁平上皮癌の多くの症例で、部分的に EMA の局在が認められる傾向があり、Sloane ら⁴⁾の報告している、高分化型扁平上皮癌症例では低分化型扁平上皮癌例より広範囲に

染色性が認められたという結果は、われわれの検索では明らかではなかった。Sloane ら⁴⁾はポリクローナル抗体を用いているので、モノクローナル抗体を用いたわれわれの結果による差は抗体の違いによるものかもしれない。癌胞巢内では Sloane ら⁴⁾の報告通り、分化傾向を示す部分に EMA の染色性が認められた。組織分化度と EMA 局在の関係は中分化型、高分化型扁平上皮癌に陽性率が高く、癌の分化度と関連するようと思われる(Table 2)。

Sloane ら⁴⁾、Bamford ら⁵⁾および、われわれの結果は EMA は重層扁平上皮の悪性化をとらえる一つのマーカーとなりうると思われる。最近、血液型物質、とくに H 物質や UEA-I レクチン結合性^{14~18)}を免疫組織化学的方法を用いて、血液型 H 物質、UEA-I レクチン結合性が扁平上皮癌の初期像をとらえる有効なマーカーであると注目されており、これら血液型物質に関連するマーカーに加えて、EMA の検索を行うことにより、癌化の初期像をより正確にとらえることが可能と思われる。

結 論

口腔扁平上皮癌42例の EMA の免疫組織化学的検索を行い、42例中31例に EMA の染色性が認められた。陽性例は高分化型・中分化型扁平上皮癌に多く認められ、癌の分化度と関連が認められた。異型上皮、癌に近接した非異型性の上皮にしばしば EMA の局在が認められた。EMA は口腔粘膜癌の初期像をとらえるうえで、一つのマーカーとなりうると思われる。

文 献

1. 藤田尚男, 藤田恒夫: 標準組織学(各論), 乳腺 328—331, 医学書院, 東京, 1976.
2. Heyderman, E., Steele, K., and Ormerod, M.G.: A new antigen on the epithelial membrane: its immunoperoxidase localization in normal and neoplastic tissues. J. Clin. Pathol., 32: 35—39, 1979.

3. Sloane, J. P. and Ormerod, M. G. : Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer*, 47 : 1786—1995, 1981.
4. Sloane, J. P., Ormerod, M. G., Carter, R. L., Gusterson, B. A., and Foster, C. S. : An immunocytochemical study of the distribution of epithelial membrane antigen in normal and disordered squamous epithelium. *Diag. Histopathol.*, 5 : 11—17, 1982.
5. Bamford, P. N., Ormerod, M. G., Sloane, J. P., and Warburton, M. J. : An immunohistochemical study of the distribution of epithelial antigens in the uterine cervix. *Obstet. Gynecol.*, 61 : 603—608, 1983.
6. Sloane, J. P., Hughes, F., and Ormerod, M. G. : An assessment of the value of epithelial membrane antigen and other epithelial markers in solving diagnostic problems in tumour histopathology. *Histchem. J.*, 15 : 645—654, 1983.
7. Gusterson, B. A., Michell, D. P., Warburton, M. J., and Carter, R. L. : Epithelial markers in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma : an immunocytochemical study. *J. Clin. Pathol.*, 36 : 628—631, 1983.
8. Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29 : 577—580, 1981.
9. 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—320, 1966.
10. Gusterson, B. A., Lucas, R. B., and Ormerod, M. G. : Distribution of epithelial membrane antigen in benign and malignant lesions of the salivary glands, *Virchows Arch. (Pathol. Anat)*, 397 ; 227—233, 1982.
11. Boretti, F., Chilosi, M., Pisa, R., Novelli, P., Zamboni, G. and Menestrina, F. : Epithelial membrane antigen expression in cholangiocarcinoma, *Virchows Arch. (Pathol. Anat)*, 401 ; 307—313, 1983.
12. Sloane, J. P., Ormerod, M. G., Imrie, S. F., and Coombes, R. C. : The use of antisera to epithelial membrane antigen in detection micrometastases in histological sections, *Br. J. Cancer*, 42 ; 392—398, 1980.
13. Sloane, J. P., Ormerod, M. G., and Neville, A. M. : Potential pathological application of immunohistochemical methods to the detection of micrometastases, *Cancer Res.*, 40 ; 3079—3082, 1980.
14. 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, 1982.
15. 賀来 亨, 館山美樹, 奥山富三, 岩井正行, 鏑原 茂, 有坂一男, 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.
16. 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, *歯科基礎誌*, 25 (Supplement) ; 171, 1983.
17. 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 : 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, *東日本歯誌*, 3 ; 37—47, 1984.
18. 賀来 亨, 奥山富三, 岩井正行, 山本悦秀, 森 道夫 : 口腔癌における血液型物質 (A, B, H) の局在, 第43回日本癌学会総会記事, p. 376, 1984.

Explanation of Figures

Fig. 1 Mild dysplasia of squamous epithelium.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 112.

B. Immunoperoxidase staining for EMA in the neighboring section shown in Fig. 1 A.

Dysplastic squamous epithelium shows staining confined the superficial layer and near the basal cell layer and also weak cytoplasmic staining. Magnification X 112.

Fig. 2 Poorly differentiated squamous cell carcinoma extending beneath the squamous epithelium.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 45.

B. Immunoperoxidase staining for EMA in neighboring section shown in Fig. 2 A.

Nondysplastic squamous epithelium near an infiltrating squamous cell carcinoma shows staining confined to the superficial layer. Focally strong reaction is shown in cancerous lesions. Counterstain with hematoxylin. Magnification X 45.

Fig. 3 High power of cancer cells shown in Fig. 2.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 112.

B. Immunoperoxidase staining for EMA.

There is the strong circumferential membrane staining of cancer cells as well as weaker cytoplasmic staining. Counterstain with hematoxylin. Magnification X 112.

Fig. 4 Moderately differentiated squamous cell carcinoma.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 45.

B. Immunoperoxidase staining for EMA in the neighboring section shown in Fig. 1 A.

Focally strong reaction is shown in cancerous lesion. Counterstain with hematoxylin. Magnification X 45.

Fig. 5 High power view shown in Fig. 4.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 112.

B. Immunoperoxidase staining for EMA.

There is the strong circumferential membrane staining of cancerous cells EMA staining is marked in well and moderately differentiated cell with ample cytoplasm (arrow). Counterstain with hematoxylin. Magnification X 112.

Fig. 6 Moderately differentiated squamous cell carcinoma.

A. Hematoxylin-eosin staining. Magnification X 112.

B. Immunoperoxidase staining for EMA.

Focally strong reaction is shown in cancerous lesion. EMA staining is marked in well and moderately differentiated cells. Counterstain with hematoxylin. Magnification X 112.







