

〔原 著〕

ラット唾液腺腫瘍発生に関する免疫組織化学的研究
—とくにDMBA誘発ラット顎下腺腫瘍発生過程におけるBrdU標識率,
ケラチンおよびS-100蛋白の局在について—

道 谷 弘 之

北海道医療大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：金澤正昭教授)

Immunohistochemical study on experimental salivary
gland carcinogenesis of rats
-BrdU labeling index, and localization of keratin and
S-100 protein during the process of
rat submandibular gland carcinogenesis-

Hiroyuki MICHIIYA

The first Department of Oral Surgery, School of Dentistry,

HEALTH SCIENCES UNIVERSITY OF HOKKAIDO

(Chief : Prof. Masaaki KANAZAWA)

Abstract

A great number of experimental studies on salivary gland carcinogenesis in rodents such as rats and mice have been reported. These studies have shown that developed tumors were almost all squamous cell carcinomas, but that the tumors sometimes contained tissue similar to adenocarcinomas. The pathogenesis of these tumors has not been established.

The aim of this study is to examine the pathogenesis of experimental salivary gland tumors by means of immunohistochemistry.

In the study, 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) pellets were surgically administered to the submandibular gland of rats, and the change in bromodeoxyuridine (BrdU) labeling index and localization of keratin and S-100 protein in the submandibular gland were evaluated immunohistochemically.

受付：平成6年3月31日

本報告の要旨は、第36回日本口腔外科学会総会（平成3年10月4日）および第40回日本口腔科学会総会（平成4年4月18日）において発表した。

The BrdU labeling index of the basal cell layer of the excretory duct and the intercalated duct increased remarkably at the early stage. At the same time, many small ducts were observed in the necrotic tissue surrounding the DMBA pellets. The ducts appeared similar to the intercalated duct both morphologically and immunohistochemically. The basal cells of the excretory duct and the intercalated-duct-like-cells proliferated, and exhibited squamous metaplasia, subsequently they formed the epidermoid cyst. The epithelia of these cysts thickened and showed papillomatous proliferation, then infiltrative proliferation and development to carcinomas. The tumors chiefly consisted of squamous-cell-carcinomatous tissues, and contained some adenocarcinomatous tissue. This suggests that they were adenoacanthoma.

These results allow the conclusion that the origin of the submandibular gland tumor is the basal cells of the excretory duct and the cells of the intercalated duct.

Key words : Rat submandibular gland carcinogenesis, 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA), BrdU labeling index, keratin, S-100 protein.

緒 言

ヒト唾液腺にみられる上皮性悪性腫瘍には、粘表皮癌・腺房細胞癌・腺様嚢胞癌・腺癌・未分化癌・多形性腺腫内癌などがある¹⁻⁴⁾が、これらの癌腫の多くは、口腔粘膜由来の扁平上皮癌とは放射線療法や化学療法に対する感受性が著しく異なり、これらの治療法に対して効果を認めない例が多い⁵⁻⁷⁾。そこで、唾液腺癌の診断および治療法の研究・開発の目的で、これらに類似した腫瘍が高率に得られる発癌実験系の確立が望まれるが、現状では見い出されていない。

マウス・ラットなど齧歯類の唾液腺に腫瘍を発生させる試みは古くより行われ、これまでに多数の報告がある⁸⁻²⁵⁾。得られる腫瘍は、上皮性の腫瘍ではその多くが扁平上皮癌とされているが、腫瘍中に腺組織の性格を示す部分もみられるといわれており⁸⁻¹¹⁾、稀に腺癌を生じたという報告もある¹²⁻¹⁴⁾。発癌剤およびその投与方法では、9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (以下DMBAと略す)、20-methylcholanthrene (以下MCと略す)などの炭化水素系発癌物質を唾

液腺局所に投与することによって、高率に腫瘍が得られている。

これらの唾液腺腫瘍の発生母地は、主に導管系の細胞であるとされているが、線条部導管であるとするもの^{14,15)}、介在部導管であるとするもの¹²⁾、顆粒管であるとするもの¹⁶⁻¹⁹⁾など種々の意見がある。さらに、腺房細胞²⁰⁻²²⁾や筋上皮細胞の関与を示唆した報告¹²⁾もあり、その由来に関しては未だ定説がない。

近年、目的の物質に対する抗体を用い、組織切片上で抗原抗体反応を起こさせることにより、その物質の局在を同定する免疫組織化学染色が広く普及し、腫瘍病理の分野でも、腫瘍の発生母地や腫瘍細胞の性格などを知る上で重要な役割を果たしている²⁶⁻²⁸⁾。ケラチンは上皮組織に広く分布する不溶性蛋白質群で、細胞骨格の中間径フィラメントを構成し、ヒトでは少なくとも19種の分子種が知られている²⁸⁻³⁰⁾。上皮細胞に存在するケラチンの分子種は、上皮の種類やその分化段階によって異なることが報告されている^{28,31)}。S-100蛋白は神経組織に特異な蛋白として知られ、グリア細胞や神経鞘細胞など

に分布しているが^{32,33)}、近年、唾液腺組織やその腫瘍にも局在が証明されている³⁴⁻⁴²⁾。一方、腫瘍などの細胞増殖動態を知る目的で、thymidineのanalogueであるbromodeoxyuridine (以下BrdUと略す) を実験動物や培養細胞・組織に投与して、増殖過程にあるS期の細胞のDNAに取り込ませ、免疫組織化学的にS期細胞を同定し、その標識率を求めることが行われている⁴³⁻⁴⁶⁾。

そこで本研究では、DMBAをラット顎下腺局所に投与することによって腫瘍の発生を試み、特に上皮性腫瘍について、腫瘍発生過程および発生腫瘍におけるケラチンおよびS-100蛋白の局在とBrdU標識率の推移を、免疫組織化学的手法により検討し、腫瘍の組織発生に関して考察を加えた。

材料および方法

1. 実験動物および発癌方法

Wistar系雄性ラット(6~7週齢)71匹を用い、実験群として58匹、対照群として13匹を使用した(表1)。発癌剤の投与は、ネンブタール腹腔内麻酔下に、ラットの頸部正中に1.5cmの皮切を加えて右側顎下腺を露出し、顎下腺の小葉間を鈍的に剝離して、その間にDMBAペレットを挿入した後、皮膚を縫合した。DMBAペレットは、DMBAを加熱溶解した後、内径0.8mmのポリエチレンチューブに吸引し、冷却固定したものを長さ1mmに切断して作製した。ペレット1個あたりのDMBAの量は0.6mgであった。

なお、対照群では、ポリエチレンチューブのみを挿入した。手術を終了したラットは、金属ケージ中で固形飼料と水を自由に与え、一定期間飼育した。

2. 観察期間および標本の作製

ラットは、発癌剤投与後1週、2週、3週、4週、8週、15週、30週で、ネンブタール腹腔内麻酔下に右側顎下腺ないし発生腫瘍を摘出し

表1 実験動物数および観察期間

DMBA投与後の 経過期間 (週)	実験動物数	
	実験群	対照群
1	7	2
2	4	2
3	6	2
4	6	1
8	10	2
15	18	2
30	7	2
計	58	13

た(表1)。なお、摘出1時間前に、S期細胞の核を標識する目的で、BrdU25mg/kgを腹腔内に投与した。摘出した組織は、直ちにカルノア固定を行い、通法にしたがって厚さ4 μ mのパラフィン包埋切片を作製し、免疫組織化学的検索に供した。

3. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は、抗BrdUマウスモノクローナル抗体(Becton and Dickinson社製)、抗ケラチン抗体3種、すなわち、抗ウシケラチンウサギポリクローナル抗体Z622(DAKO社製)、抗サイトケラチンマウスモノクローナル抗体PKK1(Labsystems社製)、抗サイトケラチンマウスモノクローナル抗体KL1(Immunotech社製)、抗ウシS-100蛋白ウサギポリクローナル抗体Z311(DAKO社製)の5種を1次抗体とし、avidin-biotin-peroxidase complex(以下ABCと略す)法にて行った(表2)。なお、抗ケラチン抗体Z622では、60, 58, 56, 52, 51, 48KD、PKK1では、52.5, 45, 40KD、KL1では、56KDのヒトケラチンサブユニットを認識するとされ、抗S-100蛋白抗体Z311は、ヒトではS-100 α および β 両ユニットを認識するとされている。

免疫組織化学染色の概略(図1)であるが、組織切片を脱パラフィンの後、内因性ペルオキ

表2 一次抗体および希釈倍率

BrdU	抗BrdU抗体 (マウスモノクローナル, Becton and dickinson)	希釈倍率 1 100
ケラチン	抗ケラチン抗体 Z622 (ウサギポリクローナル, Dakopatts)	希釈倍率 1.400
	抗サイトケラチン抗体 pkk1 (マウスモノクローナル, Labsystems)	希釈倍率 1 100
	抗サイトケラチン抗体 KL1 (マウスモノクローナル, Immunotech)	希釈倍率 1 100
S-100 蛋白	S-100 蛋白抗体 Z311 (ウサギポリクローナル, Dakopatts)	希釈倍率 1 200

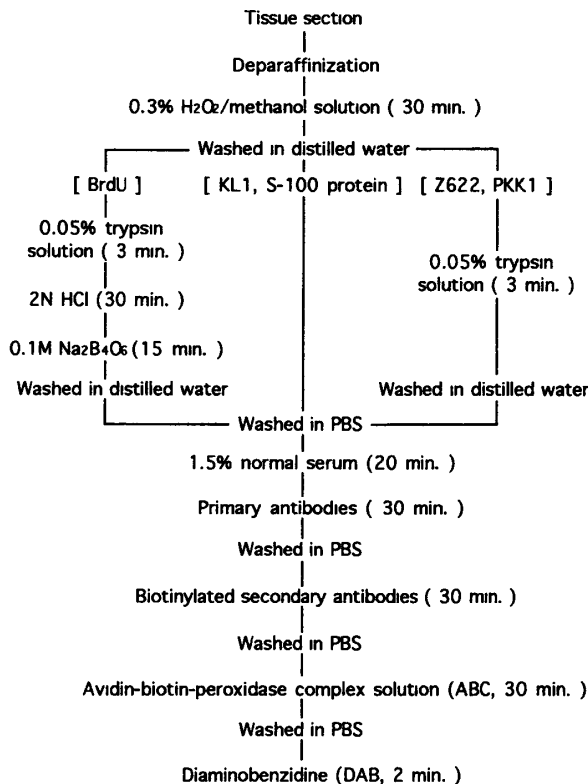


図1 ABC法による免疫組織化学染色

シターゼ活性を阻止するために0.3% H_2O_2 加メタノールで30分処理し、0.01Mリン酸緩衝生食液 (pH7.2, 以下PBSと略す) にて洗浄した後、非特異的抗原部位をブロックするために1.5%正常血清 (2次抗体の免疫動物と同種) を20分反応させ、次いで希釈1次抗体30分, 200倍希釈ビオチン化抗IgG 2次抗体 (Vector社製) 30分, ABC試薬 (Vector社製) 30分, それぞれ室温で反応させた。なおこの間, 切片は適宜PBSにて十分に洗浄を行った。発色は, 0.01% H_2O_2 加0.04%diaminobenzidine (以下DABと略す) 溶

液にて2分間反応させた。後染色はヘマトキシリンによる核染色を行い, 抗BrdU抗体では組織構築を同時に観察するために薄くヘマトキシリン・エオジン染色 (以下H.E.染色と略す) を行った。

なお, 抗BrdU抗体・Z622・PKK1では, 抗体の反応を行う前に, 抗原の賦活化のため0.05%トリプシン溶液にて室温で3分間反応させた。さらに抗BrdU抗体では, DNA単鎖化のために2N HClにて室温で30分間処理し, 0.1M $Na_2B_4O_7$ で15分間中和を行った。

また, 発生腫瘍では, ムコ多糖の陽性部位を同定するために, 切片のジアスターゼ処理を行ってグリコーゲンを消化した後に, アルシアンブルー-PAS染色を行った。

4. BrdU標識率による細胞増殖動態の評価

抗BrdU抗体を用いた免疫染色標本で, 発癌剤ペレット近傍の腺組織ないし発生腫瘍の200倍視野の顕微鏡写真を撮影し, 全細胞数とBrdU標識細胞をカウントして標識率 (BrdU標識細胞数/全細胞数 $\times 100$ [%]) を求め, 腫瘍発生過程における標識率の推移および組織による差について, 以下のような検討を行った。

1) DMBA投与後3週までの初期の段階において, 顎下腺の各構造すなわち腺房・介在部導管・顆粒管・線条部導管・集合管の標識率の推移を検討した。

2) DMBA投与後3週から15週までの, 扁平上皮化生をきたした導管上皮が増殖して嚢胞を形成する過程について, BrdU標識率の推移を検討した。なお, 標識率は, 基底層のみのカウントと, 角化層を除く上皮全層のカウントの双方を行った。

3) DMBA投与後8週から30週までに生じた嚢胞の嚢胞壁・乳頭状増殖部・扁平上皮癌部・腺癌部について, BrdU標識率の差を検討した。

なお, 写真撮影は, 同一標本でペレット近傍の視野をいくつか任意に選んで行い, 1標本に

つき2000細胞をカウントした。

結 果

1. ラットの体重変化

対照群, 実験群ともに体重は順調に増加し, DMBA投与後8週(14-15週齢)を過ぎると増加率はやや減少した。実験群ではDMBA投与後15週を経過した頃から, 対照群に比して体重の増加が少なくなるラットが現れ, 20週を過ぎると横ばいとなったが, 対照群との間に有意差は認められなかった。

2. 発生腫瘍の肉眼的所見

1) 対照群

対照群では, 実験期間中顎下腺に腫瘍を触れることもなく, とくに異常所見は認められなかった。

2) 実験群

(1) DMBA投与後1~3週

DMBA投与後3週までの時期では, 顎下腺に腫瘍を触れることもなく, とくに異常所見は認められなかった。

(2) DMBA投与後4週

DMBA投与後4週では, 41例中20例に, 直径約5mm程度の小腫瘍を顎下腺内に触知するようになった。

(3) DMBA投与後8週

DMBA投与後8週では, 肉眼的にも頸部に膨隆を認めるものが35例中7例にみられ, 触診では全例で小豆大から大豆大の腫瘍を触知し, この腫瘍は弾性やや硬, かつ, 皮膚や顎下腺周囲組織との癒着はなく, 可動性であった。比較的大きな腫瘍を認めた6例では, 腫瘍に波動を触知した。摘出物の断面をみると, ペレットを含む嚢胞腔がみとめられ, 米のとぎ汁様の内容液が認められた。

(4) DMBA投与後15週

DMBA投与後15週では, 頸部に明らかな膨隆を認めるラットが25例中19例にみられ, 腫瘍の

大きさは大豆大から示指頭大となった。しかし, 皮膚や周囲組織との癒着は認められず, 腫瘍に波動を触れるラットが12例にみられた。摘出物断面では, 全例でペレットを含む嚢胞腔を有し, 嚢胞腔内におから状の内容物が充満しているものと, 液体の貯溜を認めるものがあった。

(5) DMBA投与後30週

DMBA投与後30週では, 腫瘍はクルミ大から小児手拳大に達し, 皮膚との癒着や潰瘍形成をきたした腫瘍も認められた(写真1A)。触診では, 弾性やや硬の部分と, 軟らかく波動を触知する部分の混在している腫瘍が7例中4例, 弾性やや硬の部分が腫瘍のほとんどを占める腫瘍が3例に認められた。摘出物の断面を見ると, 内容液の貯溜した大きな嚢胞腔を有する腫瘍が4例, 充実性の腫瘍が大部分を占め, おから状の内容物が充満した嚢胞腔をとまなう腫瘍が3例に認められた(写真1B)。

3. 顎下腺の組織学的変化(表3)とBrdU標識細胞の局在

1) 対照群

対照群では, 埋入したポリエチレンチューブは一層の線維性組織で被包され, 腺組織には組織学的な変化は認められなかった(写真2A)。

2) 実験群

(1) DMBA投与後1週

DMBAペレットに接する部分の腺房に萎縮が認められ, 一部に壊死と線維組織の増生が認められた(写真2B)。ペレットに近い集合管で

表3 観察期間と組織学的所見

DMBA投与後の経過期間 (週)	動物数				
	集合管の扁平上皮化生	嚢胞形成	嚢胞上皮の乳頭状増殖	扁平上皮癌部	腺癌部
1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
2	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3	6/6	1/6	0/6	0/6	0/6
4	6/6	2/6	0/6	0/6	0/6
8	10/10	9/10	2/10	0/10	0/10
15	18/18	18/18	12/18	7/18	3/18
30	7/7	7/7	7/7	7/7	4/7

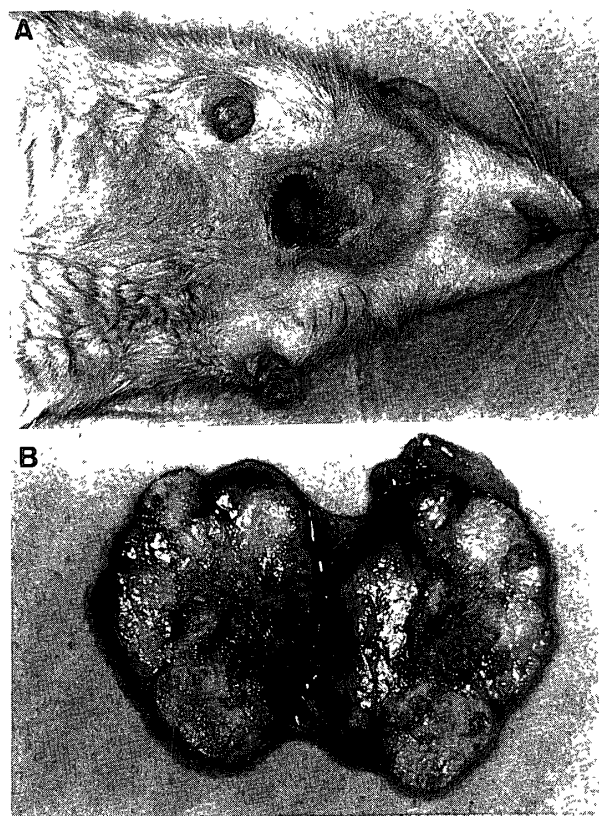


写真1 DMBA投与後30週にみられた顎下腺腫瘍

A：大きさはクルミ大に達し一部に潰瘍形成が認められる。

B：摘出した腫瘍は、線維性被膜に被包され、断面では、灰白色を呈する充実性の部分が多くを占めるが、中央部におから状の内容物を充満した囊胞腔がみられる。

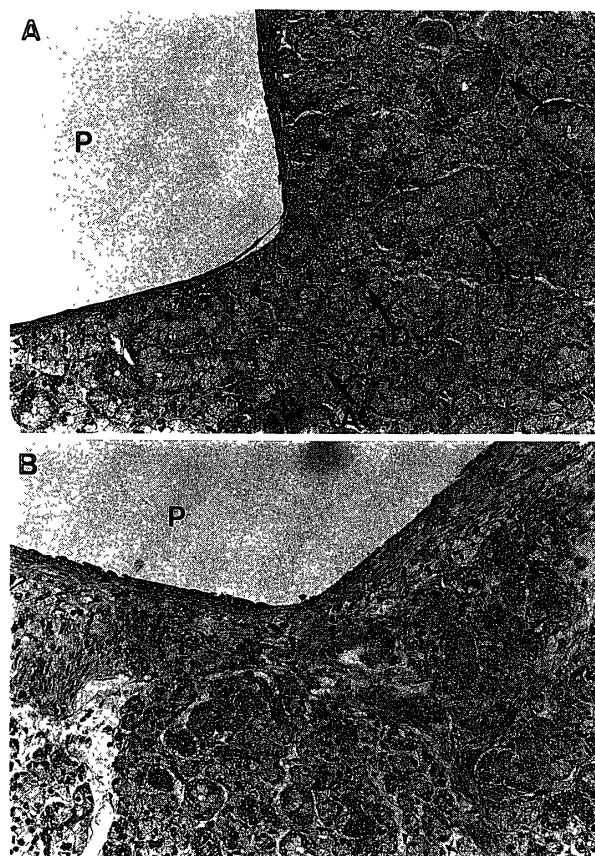


写真2 DMBA投与後1週 (BrdU-H.E.染色)

A：対照群。ポリエチレンチューブ (P) は一層の線維性組織で被包され、その周囲の腺組織にはとくに異常は認められない。腺組織中にBrdU標識細胞が散見される (×200。AC：腺房。ID：介在部。GCT：顆粒管。B：BrdU標識細胞)

B：DMBAペレット (P) 付近の腺房に萎縮が認められ、一部に壊死が認められる (×200)。

は、ペレット側の導管上皮に基底細胞の増殖による肥厚が認められ、基底層のBrdU標識細胞の増加がみられたが、管腔側の細胞は円柱状を呈したままであった。

(2) DMBA投与後2週

ペレット周囲の壊死と線維化はさらに進み、炎症性細胞浸潤が認められた。肥厚した集合管上皮に扁平上皮化生が認められ、管腔側の円柱上皮は剥離・脱落していた。上皮の肥厚増殖の著しい集合管では、管腔の狭窄が認められ、基底層を中心にBrdU標識細胞の著しい増加が認められた (写真3A)。

また、ペレット近傍の壊死組織中には、介在部に類似した小導管の残存が認められ、BrdU

の取り込みが認められた (写真3B)。壊死組織周囲の腺組織では、組織学的には正常な構造が保たれている部分が多かったが、BrdU標識細胞の増加が認められた。

(3) DMBA投与後3週

扁平上皮化生を示した集合管の管腔は、上皮の肥厚増殖によって狭窄・閉塞し、さらに周囲に上皮塊を形成した大きな上皮塊では中央部が融解して小囊胞状を呈し (写真4A)、また、これらの上皮塊がペレットを取り囲むように増殖し、角化を伴う部分も認められた。BrdU標識細胞は基底層に多数認められたが、基底層より高位にも散見された。

ペレット近傍の壊死組織中には介在部類似の

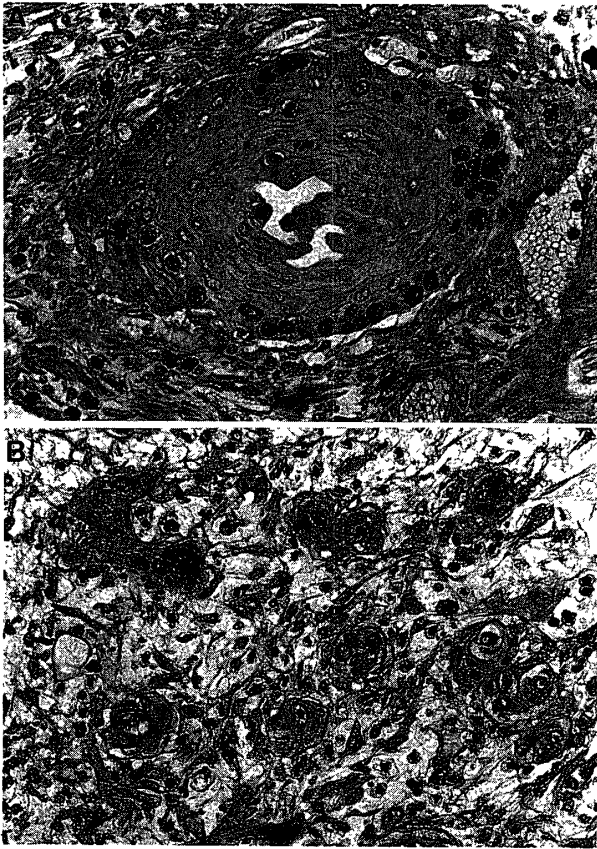


写真3 DMBA投与後2週 (BrdU-H.E.染色)
 A：ペレット周囲の壊死組織中に残存した集合管では、上皮の肥厚によって管腔が狭窄し、増殖した細胞層に細胞の扁平化が認められる。基底層を中心にBrdU標識細胞の著しい増加がみられる(×400)。
 B：ペレット周囲の壊死組織中にみられた介在部類似の小導管では、多くのBrdU標識細胞が認められる(×400)。

小導管が多数認められ、著しい増殖傾向を示して、BrdU標識細胞が多数認められた。これらの小導管では、扁平上皮化生をきたし、ペレットの周囲に増殖している所見も認められた(写真4B)。

(4) DMBA投与後4週

扁平上皮化生をきたした導管がペレットの周囲に増殖し、BrdUの取り込みの増加が認められた。一部では、化生性変化をきたした導管上皮が、ペレットを取り囲むように増殖しているのが認められた(写真5A)。

ペレットから比較的離れた壊死組織の周辺部でも腺房は萎縮ないし消失し、残存した介在部類似の小導管と、顆粒管が脱顆粒したものと思

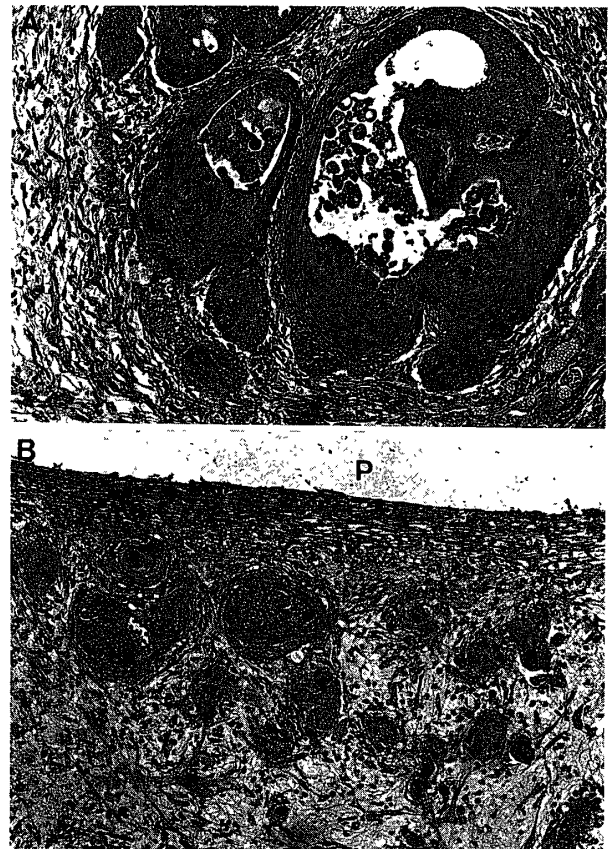


写真4 DMBA投与後3週 (BrdU-H.E.染色)
 A：扁平上皮化生をきたし増殖した導管は、上皮塊を形成し、中央部が融解して小嚢胞状を呈しているのが認められる(×200)。
 B：ペレット(P)周辺部では、扁平上皮化生をきたした小導管の増殖が認められる(×200)。

われる比較的大きな管腔を有する導管様構造が認められ、それらの周囲に、線維組織の増生とびまん性の炎症性細胞浸潤が認められた。しかし、増殖して扁平上皮化生を示した導管様構造はほとんど認められなかった(写真5B)。また、腺組織の小葉単位で、腺房細胞の萎縮・消失と、炎症性細胞浸潤を伴った多数の導管様構造の出現がみられ、この現象はペレット埋入部より末梢導管側で多くみられた。さらに、このような変化をきたした小葉との隣接部では、正常な構造を保っている小葉も観察された。

(5) DMBA投与後8週

扁平上皮化生をきたし増殖した上皮は、中心部が融解して小嚢胞状を呈し、さらにその内腔

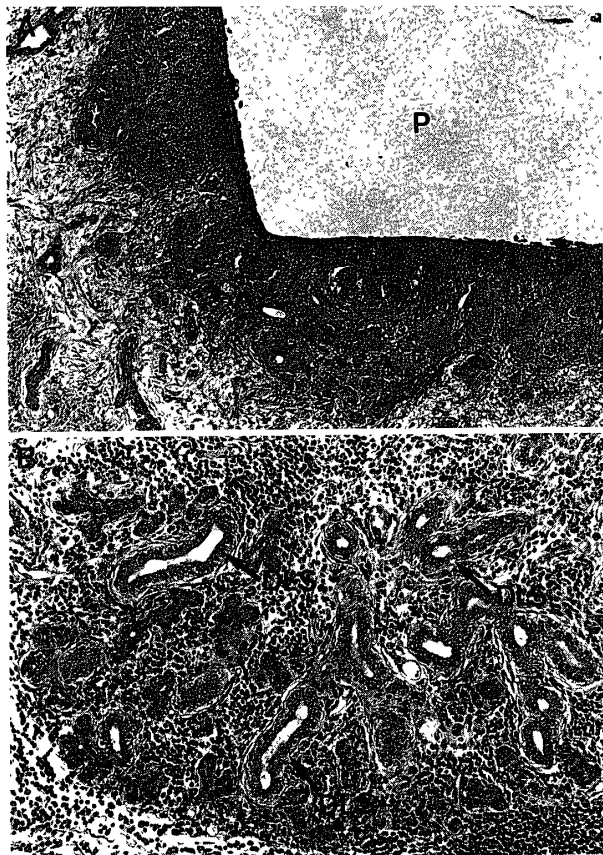


写真5 DMBA投与後4週 (BrdU-H.E.染色)

- A: 扁平上皮化生をきたした導管が、ペレット (P) を取り囲むように増殖しているのが認められる (×100)。
 B: ペレットよりやや離れた壊死組織の周辺部では、萎縮した腺房・介在部類似の小導管の他、顆粒管が脱顆粒したものと思われる比較的大きな導管様構造 (DLS) が認められる (×200)。

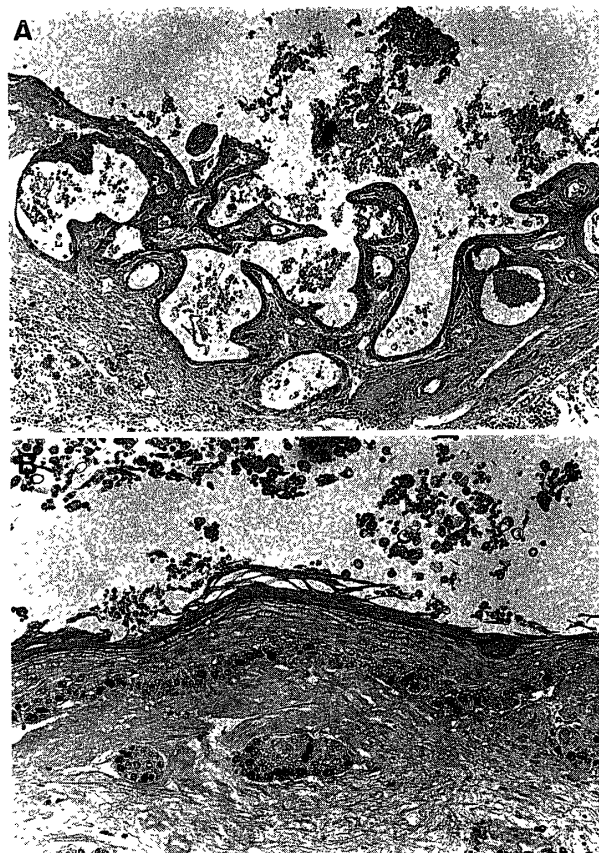


写真6 DMBA投与後8週 (BrdU-H.E.染色)

- A: 1ないし数層の細胞からなり、角化を欠く、多数の小嚢胞の形成が認められ、それらが融合して大きな嚢胞を形成している (×100)。
 B: 嚢胞壁には、上皮の肥厚と角化の亢進をきたした部分が認められる。基底層を中心にBrdU標識細胞が多数認められる (×200)。

が融合し、ペレットを取り囲む大きな類表皮嚢胞の形成が認められた。嚢胞壁には、角化層を欠いた1ないし数層の細胞から成る拡張した導管を思わせる部分と(写真6A)、薄い角化層を伴った数層の細胞からなる重層扁平上皮の部分で認められた。BrdU標識細胞は、基底層を中心に認められた。

また、嚢胞壁には上皮の肥厚と表層の角化の亢進がしばしばみられ(写真6B)、少数ではあるが、嚢胞壁が乳頭状に増殖した部分も認められた。これらの部位では、基底層より高位の細胞層にもBrdUの取り込みがみられ、BrdU標識細胞の増加が認められた。

(6) DMBA投与後15週

嚢胞壁は、上皮の乳頭状増殖・角化の亢進・上皮突起の延長・異所性の角化などを呈しているものが多く、種々の程度の上皮異形成が認められた。また、嚢胞壁の乳頭状増殖は12例(67%)にみられ(写真7A)、乳頭状増殖部から周囲へ浸潤性に増殖した扁平上皮癌が8例(44%)に認められた(写真7B)。

扁平上皮癌は、癌真珠の形成の認められる高分化型から、角化傾向のない腫瘍細胞の索状の浸潤増殖を認める低分化型まで種々認められた。これらの部分では、BrdUの取り込みが著しく増加し、分化傾向の低い扁平上皮癌ほどBrdU標識細胞が多く認められた。

また、発生腫瘍8例のうち3例は、明らかな

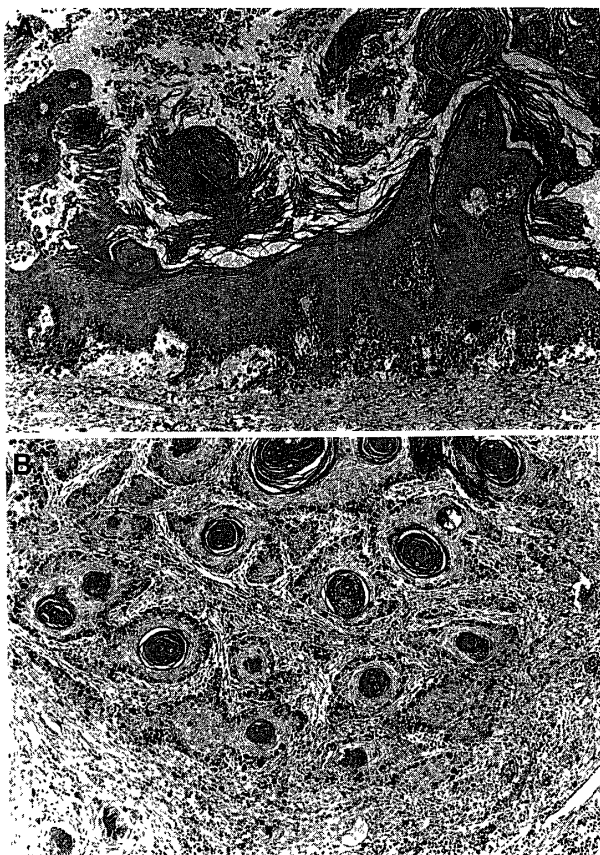


写真7 DMBA投与後15週 (BrdU-H.E.染色)
 A: 嚢胞壁には乳頭状増殖をきたした部分が認められる。基底層を中心にBrdU標識細胞の増加が著しい(×100)。
 B: 乳頭状増殖部から周囲へ浸潤性に増殖した、癌真珠の形成が著明に認められる扁平上皮癌。多数のBrdU標識細胞が認められる(×100)。

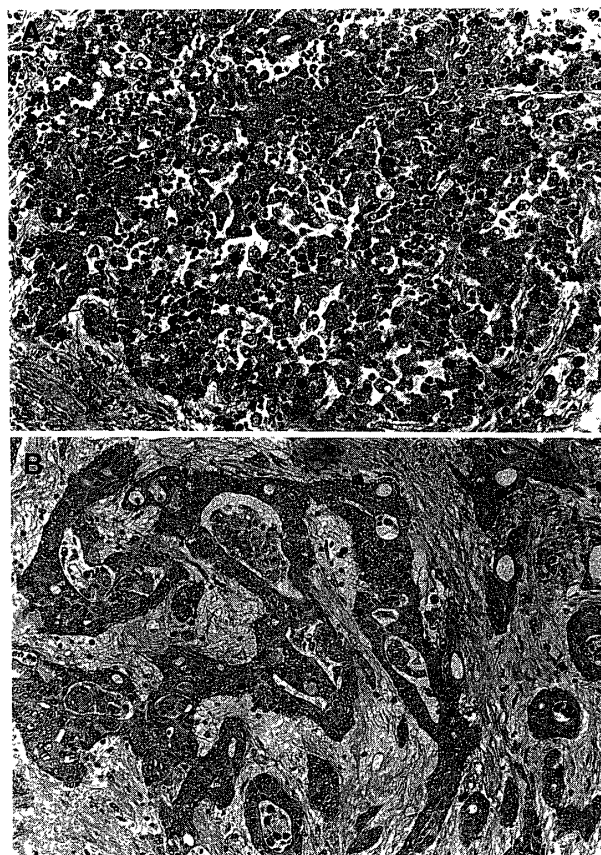


写真8 DMBA投与後30週 (BrdU-H.E.染色)
 A: 角化のほとんどない索状の癌細胞巣を呈する低分化型扁平上皮癌では、多数のBrdU標識細胞が認められる(×200)。
 B: 管腔形成を伴う腺癌部では、BrdU標識細胞は比較的少ない(×200)。

管腔構造を示す腺癌の組織像を呈する部分が腫瘍全体の20%以上を占め、これらは、扁平上皮癌の浸潤部に連続して認められた。

(7) DMBA投与後30週

30週では、7例全例で扁平上皮癌の発生がみられた(写真8A)。BrdU標識細胞の数は、15週の発癌例とほぼ同程度であった。また、明らかな管腔構造を呈する腺癌部が腫瘍全体の20%以上を占めるものが、7例中4例にみられた(写真8B)。

なお、15週および30週で発生した腫瘍のジアスターゼ消化後のアルシアンブルー—PAS染色では、腺癌部で、管腔を形成する上皮細胞と管腔内に遊離した細胞にPAS陽性の所見が認められたが、扁平上皮癌部では陰性であった(写

真9A・B)。

また、本実験により発生した腫瘍は、肉眼的にも組織学的にも全体として線維性被膜に包まれ、観察期間内ではリンパ節・肺・肝などの他臓器への転移は認められなかった。

4. BrdU標識率と細胞増殖動態

1) 発癌初期における顎下腺組織のBrdU標識率の推移(図2)

DMBA投与後3週までの初期の段階における顎下腺の各構造、すなわち腺房・介在部導管・顆粒管・線条部導管・集合管の標識率の推移の検討においては、対照群では標識率に大きな変化は認められなかったが、介在部導管の標識率が他の構造の標識率よりも高い値を示した。

実験群では、全てにおいて対照群より高い標

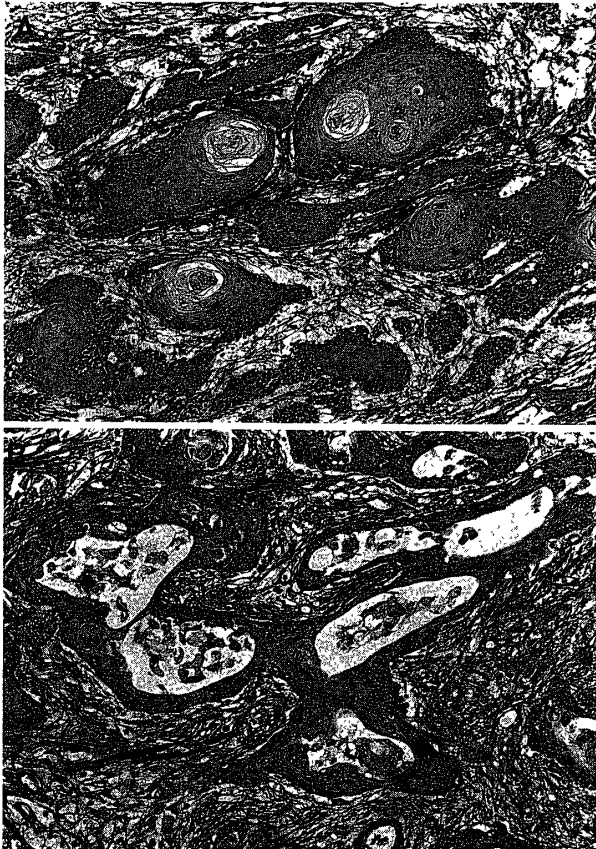


写真9 DMBA投与後30週（アルシアンブルー・PAS染色）

A：高分化型扁平上皮癌部では，アルシアンブルー，PASともに陰性である（×200）。
 B：腺癌部では，管腔を形成する上皮細胞と管腔内に遊離した細胞に，PAS陽性の所見が認められる（×200）。

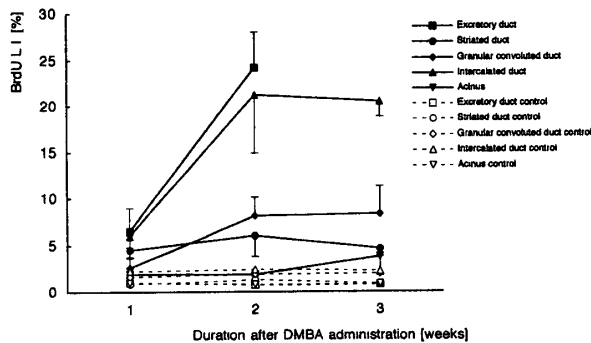


図2 初期における標識率の推移

識率を示したが，介在部導管と集合管の標識率が最も高く，時間の経過とともに急激に上昇し，20%以上に達した。顆粒管の標識率も時間とともに上昇傾向を示し，8%以上となったが，線条部導管および腺房細胞では，多少増加するにとどまった。

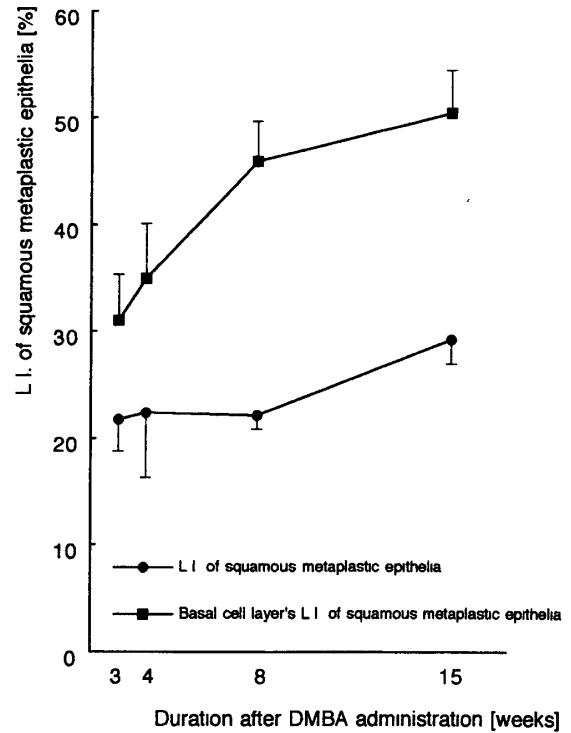


図3 嚢胞形成過程におけるBrdU標識率の推移

2) 嚢胞形成過程におけるBrdU標識率の推移 (図3)

DMBA投与後3週から15週までの，扁平上皮化生をきたした導管上皮が増殖して嚢胞を形成する過程では，基底層のBrdU標識率は，時間の経過とともに上昇し，15週では50%以上に達した。角化層を除く上皮全層の標識率は，8週までは大きな変化はなく，15週に上昇傾向を示した。

3) 組織学的所見とBrdU標識率 (図4)

発癌剤投与後8週から30週までの，嚢胞壁・乳頭状増殖部・扁平上皮癌部・腺癌部のBrdU標識率では，扁平上皮癌部が最も高く50%に達し，次いで乳頭状増殖部，嚢胞壁の順であった。腺癌部では，20%弱とやや低い値を示した。

5. ラット正常顎下腺におけるケラチンおよびS-100蛋白の局在 (表4)

1) ラット正常顎下腺におけるケラチンの局在

(1) Z622について

ラット正常顎下腺では，Z622（ヒトでは，60，

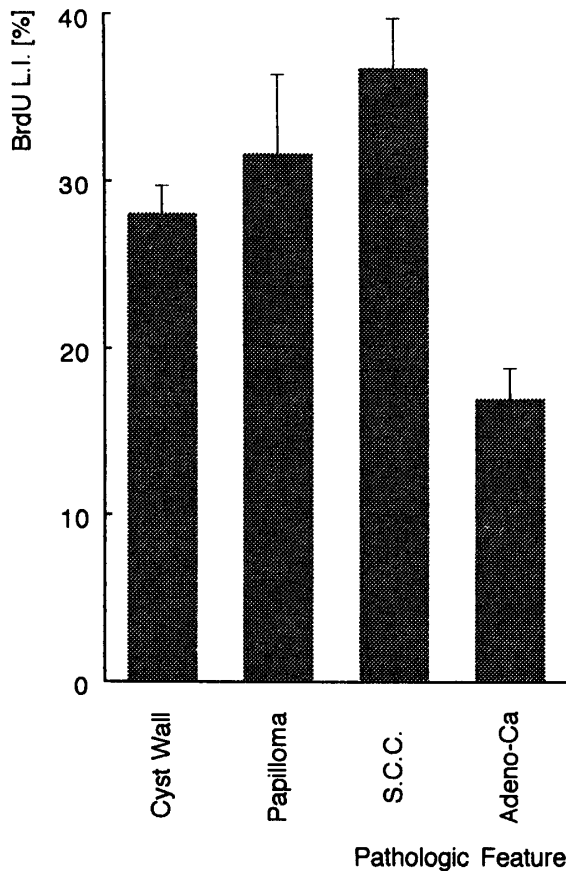


図4 BrdU標識率と組織学的所見

58, 56, 52, 51, 48KDのケラチンサブユニットを認識)を用いた免疫組織化学染色によって、集合管・線条部導管・顆粒管・介在部導管・腺房細胞・筋上皮細胞と広い範囲に陽性像を示した。特に、集合管の基底層と介在部導管に強い反応を示したが、顆粒管および腺房細胞での反応はやや弱かった(写真10A)。

(2) PKK1について

PKK1(ヒトでは、52.5, 45, 40KDのケラチンサブユニットを認識)では、介在部導管と集合管の管腔側の細胞が特に強い陽性像を呈し、

表4 ラット正常顎下腺におけるケラチンおよびS-100蛋白の局在

	集合管	線状部導管	顆粒管	介在部導管	腺房	筋上皮
Z622	(+++)	(++)	(+)	(+++)	(+)	(+)
PKK1	(++)	(+)	(+)	(++)	(+)	(-)
KL1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)
S-100 蛋白	(++)	(++)	(+)	(+/-)	(-)	(-)

線条部導管・顆粒管・腺房細胞にも弱い反応が認められた。なお、筋上皮細胞は陰性であった(写真10B)。

(3) KL1について

KL1(ヒトでは、56KDのケラチンサブユニットを認識)では、腺房細胞に弱い陽性像を認める場合と陰性の場合があり、その反応性は一定しなかった。その他では、陽性像は認められなかった(写真10C)。

2) ラット正常顎下腺におけるS-100蛋白の局在

S-100蛋白は、集合管・線条部導管に陽性で、顆粒管にも弱い陽性像が認められた。また、介在部導管では、極めて弱い陽性像を認める場合と陰性の場合があり、その反応性は一定しなかった。筋上皮細胞は陰性であった(写真10D)。

6. 発癌過程および発生腫瘍におけるケラチンの局在(表5)

1) DMBA投与後1週

DMBA投与後1週では、基底層の増殖による集合管上皮の肥厚がすでにみられるが、Z622では上皮全層が陽性像を示し、特に基底層および増殖した基底細胞が強い陽性を示した(写真11A)。これに対しPKK1では、管腔側の一層の細胞のみが陽性像を呈した(写真11B)。PKK1陽性を示す管腔側の細胞は、この時期ではまだ円柱状を呈しており、扁平上皮化生はみられなかった。また、KL1は陰性であった。

2) DMBA投与後2週

DMBA投与後2週では、PKK1陽性を呈していた集合管の管腔側の細胞は剝離脱落し、扁平上皮化生をきたすものが多くなった。扁平上皮化生をきたした集合管では、Z622の染色性がやや低下し、PKK1は陰性となったが、逆にKL1では、扁平化した細胞は陽性所見を示すようになった。また、ペレット近傍の壊死組織中には、介在部に類似した小導管の残存が認められ、この小導管はZ622が強陽性(写真12A)、PKK1は

表5 腫瘍発生過程および発生腫瘍におけるケラチン・S-100蛋白の局在

DMBA投与後の 経過期間	2-4 週			8-15 週			15-30 週		
	導管構造		扁平上皮化 生じた導管上皮	頸表皮細胞			発生腫瘍		
	介在部 類似の 小導管	顆粒管が脱 顆粒した導 管構造		非角化部	角化部	乳頭状 増殖部	高分化型 扁平上皮 癌部	底分化型 扁平上皮 癌部	腺癌部
Z622	(+++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+++)	(++)
PKK1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(++)
KL1	(-)	(-)	(+)	(+/-)	(++)	(++)	(++)	(+/-)	(-)
S-100 蛋白	(+/-)	(++)	(+/-)	(-)	(++)	(++)	(++)	(+/-)	(+/-)

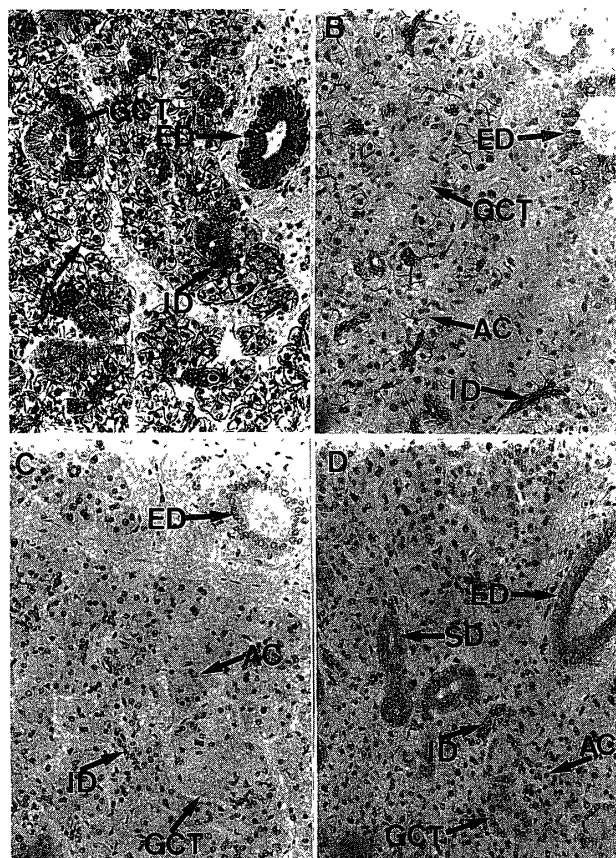


写真10 ラット正常顎下腺 (ケラチンおよびS-100蛋白の免疫染色)

- A (Z622) : 集合管・線条部導管・顆粒管・介在部導管・筋上皮に陽性像を呈し、とくに集合管・介在部導管に強い陽性像が認められる (×200)。
- B (PKK1) : 集合管の内腔側の細胞と介在部導管に陽性像が認められ、線条部導管・顆粒管・腺房細胞も弱陽性である (×200)。
- C (KL1) : 腺房細胞に弱い陽性像が認められるが、その他は陰性である (×200)。
- D (S-100蛋白) : 集合管・線条部導管に陽性で、顆粒管にも弱い陽性像が認められ、介在部では陰性ないし弱陽性である (×200)。
(AC: 腺房。ID: 介在部。GCT: 顆粒管。SD: 線条部。ED: 集合管。)

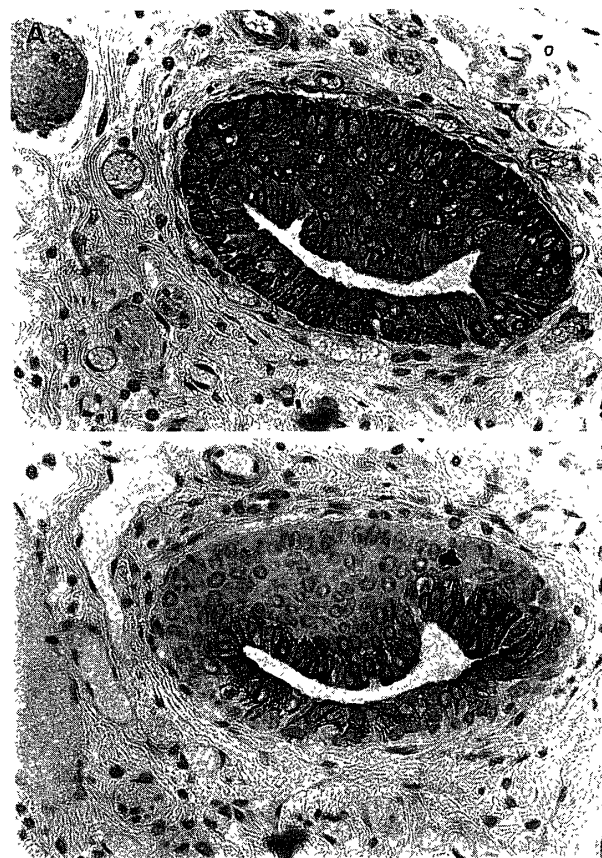


写真11 DMBA投与後1週のペレット付近の集合管 (ケラチン免疫染色)

- A (Z622) : 肥厚した集合管上皮全層に陽性像を呈する (×400)。
- B (PKK1) : 集合管の管腔側の細胞のみ陽性像を呈する (×400)。

弱陽性で (写真12B), KL1は陰性であった。

3) DMBA投与後3週

DMBA投与後3週では, 扁平上皮化生をきたした集合管上皮はペレット周囲に増殖し, この部では, Z622は上皮全層で陽性, KL1は基底層を除く上皮上層で陽性であった。この時期になると, 同様に扁平上皮化生を示す小導管の著しい増殖が認められ, この部のPKK1は陰性所見を示したが, Z622では上皮全層で陽性を示し (写真13A), これまで陰性であったKL1も陽性の所見を呈した (写真13B)。ペレットからやや離れた部分に認められた比較的大きな管腔を有する導管様構造では, Z622およびPKK1の染色性がやや増加し, KL1は陰性のままであった。

4) DMBA投与後4週

DMBA投与後4週では, 扁平上皮化生を示した導管上皮はペレットを取り囲むようにさらに

増殖し, 一部には角化を伴う部分も認められた。これらの上皮全層でZ622は陽性を示し, KL1では基底層を除く上皮上層で陽性所見が認められた。

5) DMBA投与後8週

DMBA投与後8週になると, 扁平上皮化生をきたして増殖した導管上皮は内部が融解して小嚢胞状を呈し, これらが融合してペレットを取り囲む大きな嚢胞の形成が認められた。嚢胞壁の角化を欠いた部分では, Z622は上皮全層で陽性 (写真14A), PKK1は内腔側の細胞層で陽性 (写真14B), KL1陰性 (写真14C) の部分が多かった。角化重層扁平上皮の部分では, Z622は上皮全層で陽性 (写真15A), PKK1は角化層のみ陽性を示し (写真15B), KL1では基底層を除く上皮上層で陽性を示す部分が多く, 陽性部は上皮の肥厚と角化の亢進の著しい部位であった

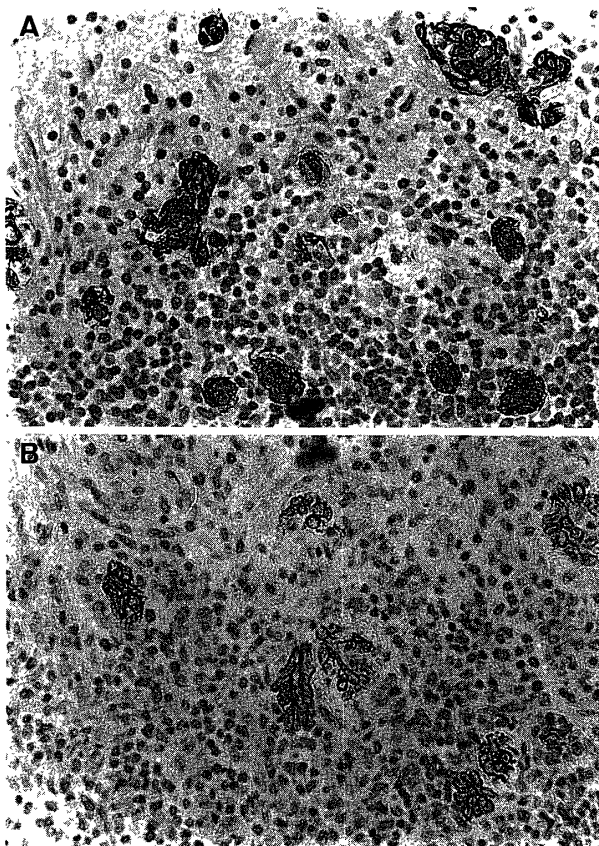


写真12 DMBA投与後2週の介在部類似の残存小導管 (ケラチン免疫染色)

A (Z622) : 小導管は強陽性を示す (×400)。

B (PKK1) : 小導管は陽性像を呈する (×400)。

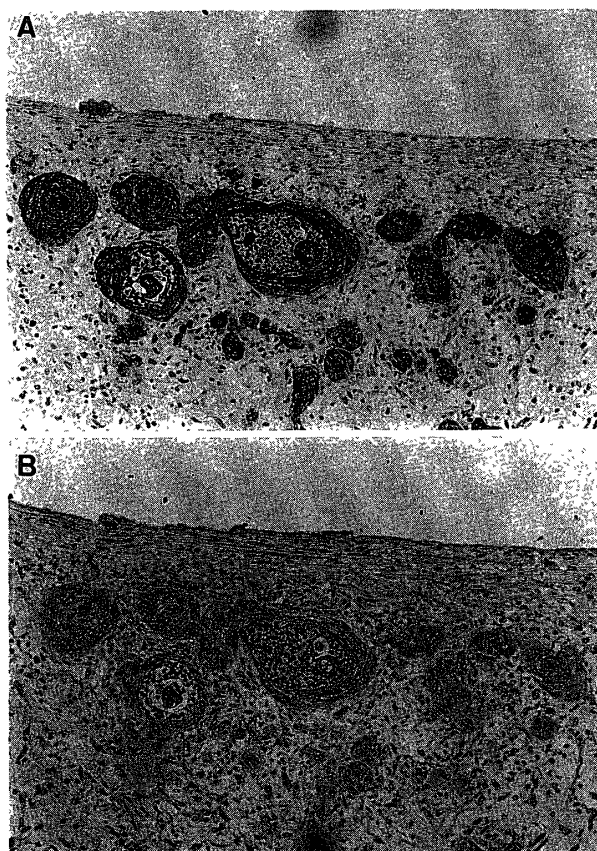


写真13 DMBA投与後3週の扁平上皮化生を示し, 増殖する小導管 (ケラチン免疫染色)

A (Z622) : 上皮全層で陽性像を呈する (×200)。

B (PKK1) : 扁平上皮化生をきたした導管では, 陽性像を示す (×200)。

(写真15C)。

6) DMBA投与後15~30週

DMBA投与後15週を経過すると、嚢胞壁を裏装している上皮の大部分は角化重層扁平上皮で、上皮突起の延長・乳頭状増殖・上皮異形成がみられるが、これらの部位でもZ622は全層で陽性(写真16A)、PKK1は角化層のみ陽性(写真16B)、KL1は基底層を除く上皮上層で陽性(写真16C)であった。

DMBA投与後15から30週に生じた腫瘍は、その多くが扁平上皮癌の組織像を呈していたが、高分化型ではZ622は上皮全層で陽性(写真17A)、PKK1は角化層に陽性(写真17B)、KL1は基底層を除く上皮上層に陽性の所見が認められた(写真17C)。低分化型でもZ622は全ての癌

細胞で陽性を示したが(写真18A)、PKK1およびKL1では陰性ないし散在性に陽性細胞を認めるのみであった(写真18B・C)。また、癌の浸潤先端部では、Z622が特に強い陽性像を呈した。

腫瘍組織の一部に管腔形成を伴った腺癌の性格を示す部分が認められたが、この部では、Z622が陽性(写真19A)、PKK1は管腔側の細胞層のみ陽性(写真19B)、KL1では陰性ないし散在性に陽性細胞を認めるのみであった(写真18C)。

7. 発癌過程および発生腫瘍におけるS-100蛋白の局在(表5)

正常顎下腺の集合管ではS-100蛋白の陽性像がみられたが、扁平上皮化生をきたす過程で染色性の低下が認められた(写真20A)。また、発癌

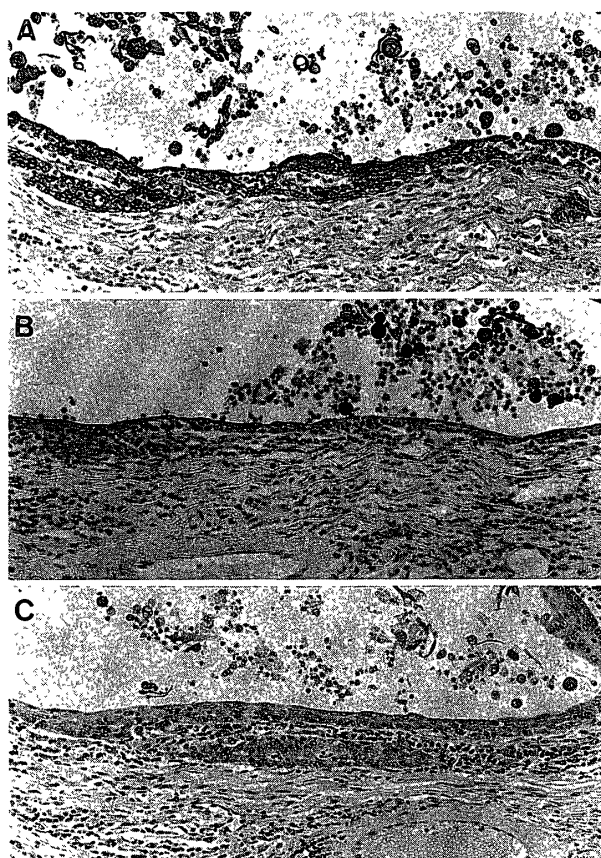


写真14 DMBA投与後8週の角化を欠いた嚢胞壁(ケラチン免疫染色)

- A (Z622) : 上皮全層で陽性像を呈する (×200)。
 B (PKK1) : 内腔側の細胞のみ陽性示す (×200)。
 C (KL1) : 陰性ないし弱陽性を呈する (×200)。

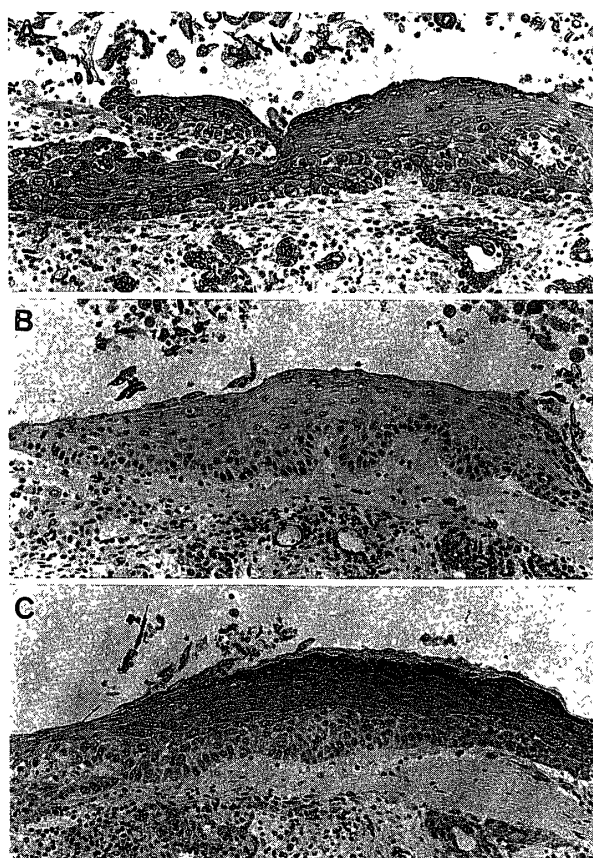


写真15 DMBA投与後8週の上皮の肥厚・角化を伴う嚢胞壁(ケラチン免疫染色)

- A (Z622) : 上皮全層に陽性像を呈す (×200)。
 B (PKK1) : 角化層にわずかに陽性像が認められる (×200)。
 C (KL1) : 基底層を除く上皮上層に、強い陽性像が認められる (×200)。

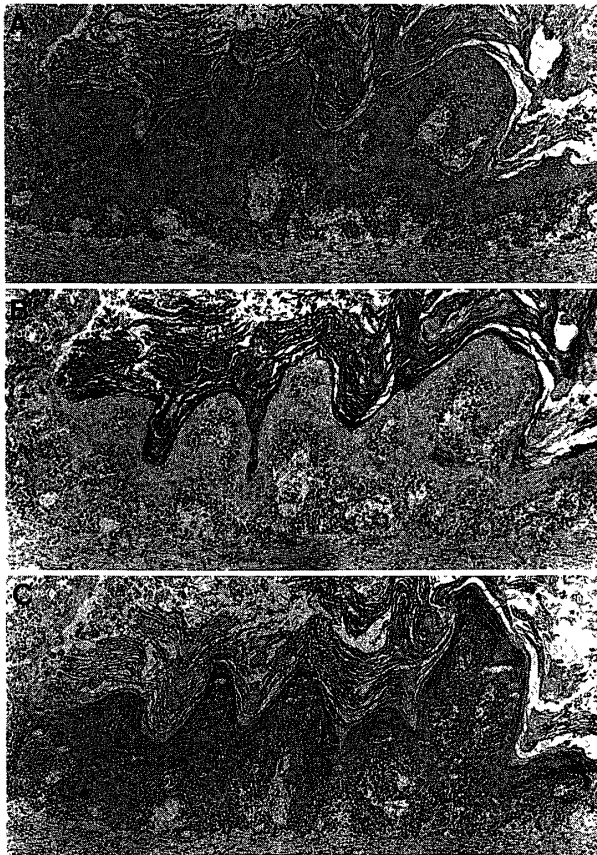


写真16 DMBA投与後15週の嚢胞壁の乳頭状増殖部(ケラチン免疫染色)

A (Z622) : 上皮全層に陽性像を呈する (×100)。
B (PKK1) : 角化層のみに陽性像を呈する (×100)。
C (KL1) : 基底層を除く上皮上層に陽性像を呈する (×100)。

初期のペレット周囲の壊死組織中に残存した介在部類似の小導管では、弱陽性ないし陰性で、扁平上皮化生をきたした部分では陰性の部分が多かった、壊死組織周囲の比較的大きな導管様構造では、陽性像を呈していた(写真20B)

嚢胞壁では、S-100蛋白陽性の部分と陰性の部分が認められ、陽性像は、上皮の肥厚および角化の亢進のみられる部分や、乳頭状増殖部に認められた(写真21A・B)。また、この時期では、核にもS-100蛋白の陽性所見が認められた。

発生腫瘍では、高分化型扁平上皮癌の角化層およびその周囲は陽性で、嚢胞壁と同様核にも染色性が認められたが(写真22A)、浸潤先端部は陰性であった。一部にみられた管腔構造を呈した腺癌の部分では、陰性ないし弱陽性であっ

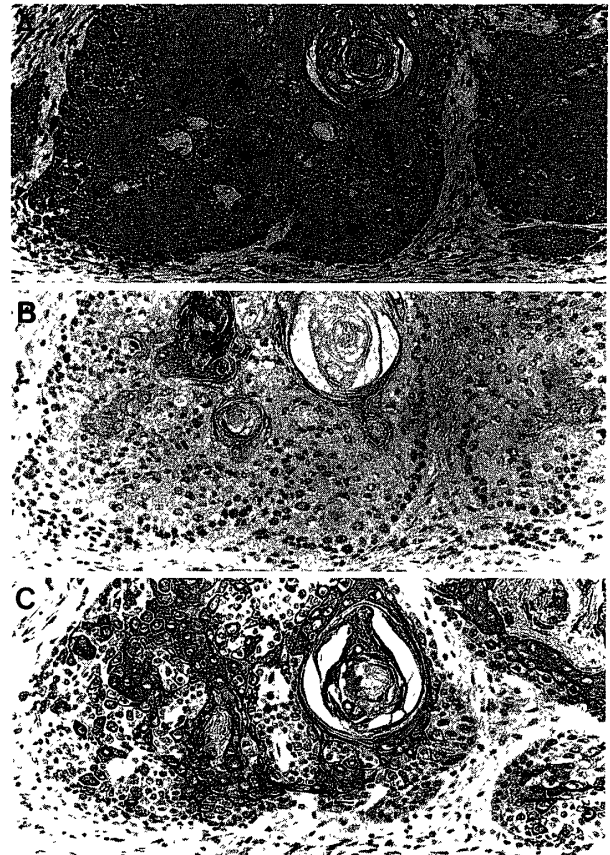


写真17 DMBA投与後30週の高分化型扁平上皮癌部(ケラチン免疫染色)

A (Z622) : 癌胞巣全体に陽性像を呈する (×200)。
B (PKK1) : 角化層にわずかに陽性像が認められる (×200)。
C (KL1) : 基底層を除く上皮上層に陽性像を呈する (×200)。

た(写真22B)。

考 察

1. 発生腫瘍について

癌の疾患モデルの確立は、その組織発生や、診断および治療法の研究に重要な意味を持つとされ、今日までに種々の臓器で発癌モデルが確立されている⁴⁷⁾。

ヒト唾液腺にみられる上皮性悪性腫瘍は組織学的に多彩であり、粘表皮癌、腺房細胞癌、腺様嚢胞癌、腺癌、扁平上皮癌、未分化癌、多形性腺腫内癌などがある¹⁻⁷⁾。口腔外科領域では、粘表皮癌、腺様嚢胞癌、多形性腺腫内癌の頻度が高いとする報告が多く^{7,48-50)}これらの癌腫は、口腔領域で最も高頻度に見られる口腔粘膜

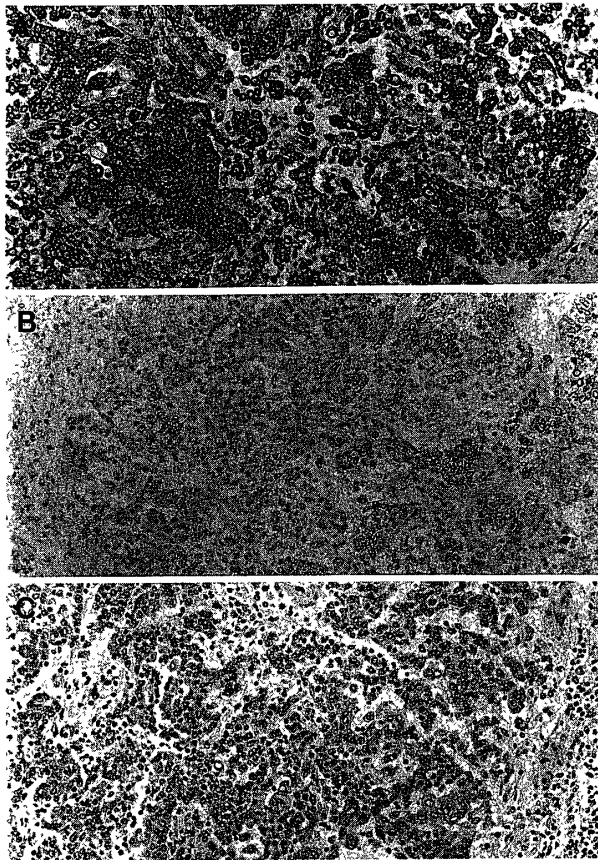


写真18

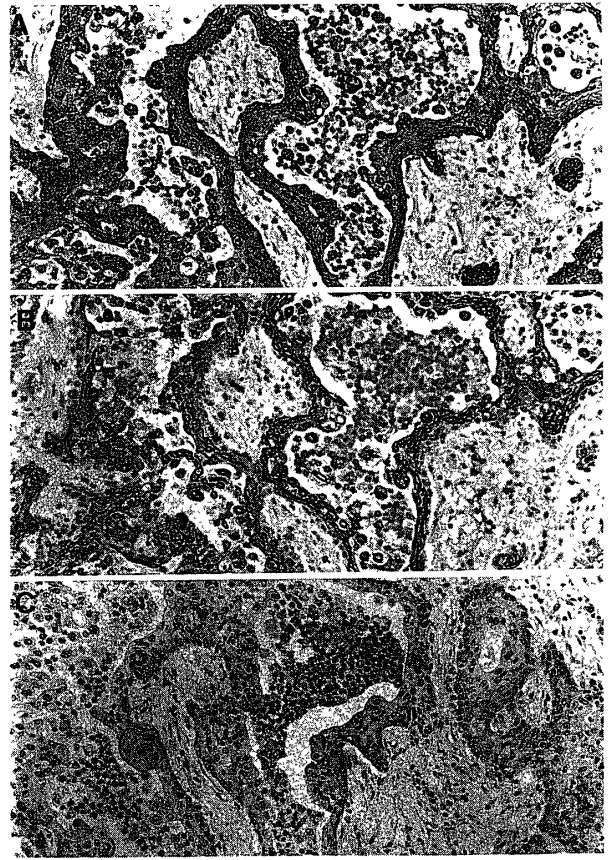


写真20

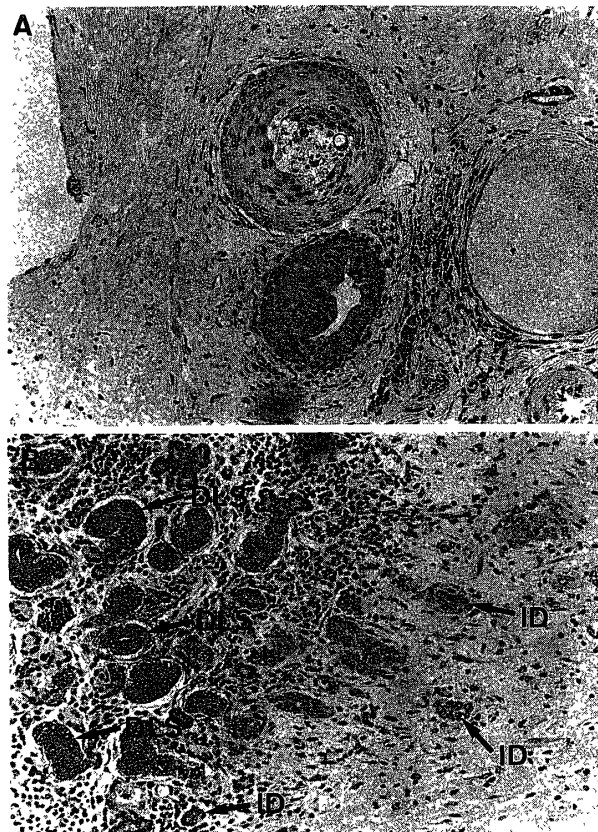


写真19

写真18 DMBA投与後30週の低分化型扁平上皮癌部 (ケラチン免疫染色)

- A (Z622) : 癌巣全体に陽性像を呈する (×200)。
- B (PKK1) : 散在性に陽性像が認められるのみである (×200)。
- C (KL1) : 陰性ないし弱陽性である (×200)。

写真19 DMBA投与後30週の腺癌部 (ケラチン免疫染色)

- A (Z622) : 癌巣全体に陽性像を呈する (×200)。
- B (PKK1) : 管構造を呈する癌巣の管腔側の細胞にのみ陽性像を呈する (×200)。
- C (KL1) : 陰性ないし弱陽性である (×200)。

写真20 DMBA投与後3週 (S-100蛋白免疫染色)

- A : ペレット周囲に残存した集合管では、上皮の肥厚・扁平上皮化生がみられ、S-100蛋白の染色性は低下している (×200)。
- B : ペレット付近に残存した介在部類似の小導管 (ID) では、S-100蛋白は陰性ないし弱陽性であったが、その周囲に認められた比較的大きな導管構造 (DLS) では、陽性像を呈する (×200)。

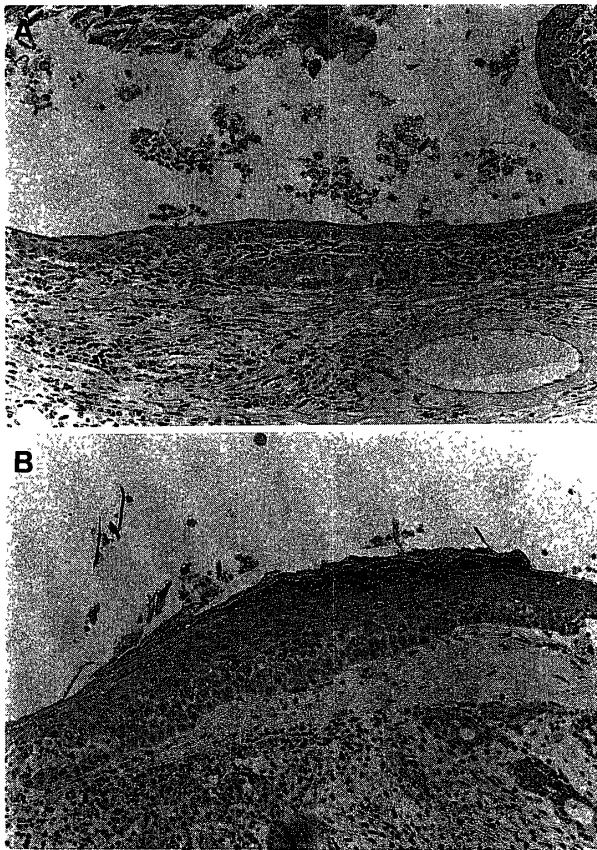


写真21 DMBA投与後8週 (S-100蛋白免疫染色)

- A: 嚢胞壁の角化を欠く部分では、S-100蛋白は陰性ないし弱陽性を呈する (×200)。
 B: 上皮の肥厚・角化の亢進のみられる嚢胞壁では、S-100蛋白は基底層を除く上皮上層に陽性像を呈する (×200)。

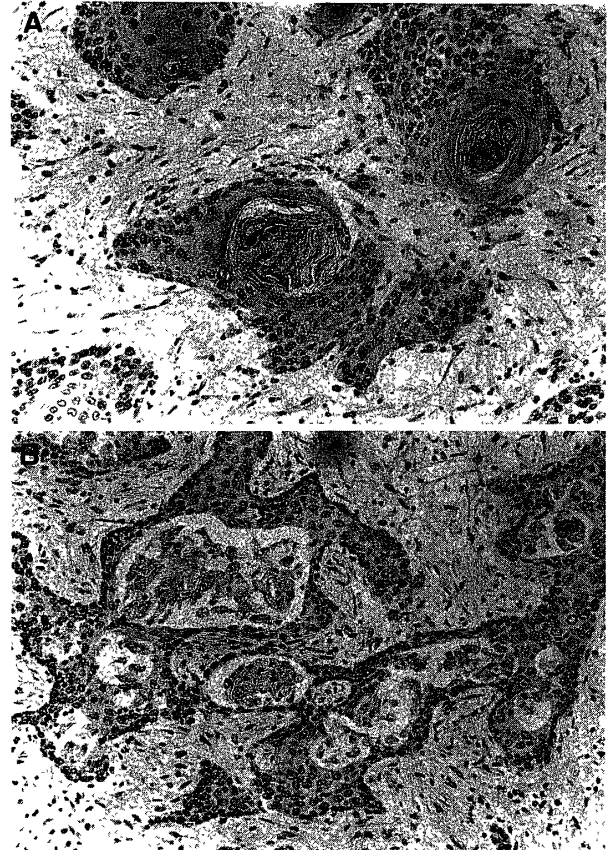


写真22 DMBA投与後30週 (S-100蛋白免疫染色)

- A: 高分化型扁平上皮癌部では、S-100蛋白は角化層の周囲に陽性像を呈する (×200)。
 B: 管腔構造を呈する腺癌部では、S-100蛋白は陰性ないし弱陽性である (×200)。

上皮由来の扁平上皮癌とは、放射線療法や化学療法に対する反応が著しく異なり、これらの治療法に対してほとんど効果を認めない例が多い⁵⁻⁷⁾。したがって、これらに類似した腫瘍が高率に得られる発癌実験系の確立が望まれるが、文献を渉猟した範囲では見い出されていない。

唾液腺においては、古くより実験的腫瘍発生の試みがなされてきた。とくに、癌原性を有する芳香族炭化水素系物質が発癌実験に使用されるようになってからは多数の報告がみられ、マウス・ラット・ハムスターなど齧歯類の顎下腺や耳下腺内に直接DMBA・MCなどの炭化水素系発癌物質を投与することによって腫瘍の発生が試みられている^{8-25,51-55)}。発生腫瘍は、扁平上皮癌⁸⁻²⁵⁾と線維肉腫⁵¹⁻⁵⁵⁾が大部分を占めるとの報告が多い。

前述の唾液腺発癌実験系でみられる扁平上皮癌では、種々の程度で管腔形成と粘液の貯溜を伴う腺癌の組織像が混在していることが少なくない⁸⁻¹¹⁾。また、稀に扁平上皮癌の組織を欠く、腺癌の発生をみたという報告もある¹²⁻¹⁴⁾。

生田⁸⁾、榎本⁹⁾は、類表皮癌と腺癌の双方の組織像を備えた中間型の腫瘍が多かったと述べており、塩田ら¹⁰⁾、河原ら¹¹⁾も同様の所見を記載している。これらの腫瘍は、粘表皮癌としてよいという意見があり⁸⁾、もしそうであるとすれば、粘表皮癌のモデルとして検討に値する。事実、ヒトの粘表皮癌の中には、扁平上皮癌の組織像が腫瘍の多くを占め、角化を伴うこともあるとされており、このように扁平上皮への化生傾向の強い粘表皮癌でも、癌胞巢内に必ず粘液産生細胞が存在するという^{3,4)}。

ヒトでは、同一癌胞巢内に扁平上皮癌と腺癌の両者の像が同時に認められるものとして、唾液腺の粘表皮癌のほか、肺・甲状腺・胃・子宮などにみられる腺棘細胞癌 (adenocanthoma) あるいは腺扁平上皮癌 (adenosquamous cell carcinoma) がある⁵⁶⁻⁵⁸⁾。これらは、いずれも扁平上皮としての、また腺としての性格を備えているが、粘表皮癌とは別に扱われていることが多く、扁平上皮癌部に明瞭な角化傾向を示すものを腺棘細胞癌 (adenocanthoma) と呼ぶことが多い^{56,57)}。ヒトでは、唾液腺の腺扁平上皮癌 (adenosquamous cell carcinoma) の報告は極めて稀である⁵⁸⁾。

Steiner²⁰⁾, Bauer and Byrne¹²⁾は、唾液腺発癌実験でみられた扁平上皮癌と腺癌の像が混在する腫瘍を、acantho-adenocarcinomaあるいはadenocanthomaと記載しており、河原ら¹¹⁾も、腺扁平上皮癌との表現を採用している。

今回の実験で得られた腫瘍では、発癌剤投与後15週でみられた扁平上皮癌8例のうち3例、30週でみられた扁平上皮癌7例のうち4例で、腫瘍全体の20%以上に明らかな管腔形成を伴った腺癌の組織像を認め、これらの組織は、扁平上皮癌に連続して認められた。また、これらの腺癌部の管腔を形成する細胞と、管腔内に遊離した細胞には、切片のジアスターゼ処理後のアルシアンブルー-PAS染色でもPAS陽性の所見が認められた。このことにより、本腫瘍は、腺扁平上皮癌としてよいものと考えられる。

一般に、ヒト唾液腺に生じる腫瘍では、悪性であっても発育が緩慢で、線維性被膜を有することが多い²⁻⁷⁾。今回の実験で発生した腫瘍も概ね線維性の被膜で被包され、また、転移を認められたものはなく、過去の実験的唾液腺腫瘍の報告でも、同様の所見が得られている^{8,11,12)}。

2. 腫瘍発生過程の組織変化について

実験で使用したDMBAペレットは、ポリエチレンチューブによってペレットの形態が保持さ

れ、組織切片上で発癌剤を含むペレットの位置が常に特定できた。腫瘍発生過程の検索の上で、組織像の変化とペレットの位置関係を把握できるこの方法は、非常に有効であった。

これまでの報告をみると、発癌過程の初期では、腺房の萎縮ないし消失が起り、ペレット周囲に壊死を生じるとされている⁸⁻¹⁶⁾。今回の実験においても同様の所見が認められ、これと並行してペレット近傍の集合管上皮基底層の増殖肥厚、さらには扁平上皮化生が認められた。この変化が、まだペレット周囲腺組織の変性壊死がわずかした進行していない1週にすでにみられたことは、注目すべき所見であると思われる。初期における導管上皮の扁平上皮化生は、過去の報告にもしばしばみられるが⁸⁻²⁶⁾、集合管上皮が扁平上皮化生をきたしたとの記載はない。

今回の実験で、初期にみられるペレット周囲の壊死層では、ペレットの直近にも介在部に類似した非常に小さな導管様上皮の残存が散見された。これは、Z622の免疫染色によって明瞭に観察することができた。類似の所見は、生田⁸⁾、榎本⁹⁾の報告にもみられるが、この小導管が介在部かどうかを明瞭には識別できなかったとしている。本実験では、壊死組織中に残存した小導管上皮が、集合管上皮とともに増殖して扁平上皮化生をきたし、その後、類表皮嚢胞を形成した。このように、発癌に先行して導管上皮の扁平上皮化生が起り、さらに類表皮嚢胞の形成がみられるという報告は比較的多い^{14,15,20-25)}が、これには否定的な見解もある¹¹⁾。ペレットからやや離れた壊死層周辺部では、前述の小導管の他、顆粒管が脱顆粒をきたしたものと思われる比較的大きな管腔を有する導管様構造も認められた。このように、発癌初期に2種類の導管様構造が認められることは、kimら²²⁾も指摘している。しかし、本実験では、顆粒管由来の導管様構造が、扁平上皮化生をきたした所見はほ

とどなかった。また、DMBA投与後3週では、集合管が上皮の増殖によって閉塞したものが多かったが、同時期に、ペレットから離れた部位でも、小葉単位で腺房の萎縮と多数の導管様構造の出現がみられた。これは、導管結紮による唾液腺の変化と同様であり^{59,60)}、その小葉を支配域とする集合管が閉塞したために生じたものと思われた。この導管閉塞性の変化は、Standish¹⁵⁾、生田⁸⁾も観察している。

本実験における発癌過程では、嚢胞上皮の肥厚・角化の亢進・乳頭状増殖を経て浸潤性増殖に至り、明らかな癌形成を示したものが大部分を占めている。従来^{8,9,15,20)}の報告でも、同様の見解をとっているものが少なくない^{8,9,15,20)}。

3. BrdU標識率について

周知のごとく、細胞分裂の過程でDNA合成の行われている時期は、細胞周期のS期といわれている。したがって、S期細胞を同定し、組織内のS期細胞の比率を求めることによって、その組織の増殖活性を知ることができる。thymidineがS期細胞のDNA内に取り込まれることから、従来より、³H-thymidineを用いたオートラジオグラフィにより、組織切片上でS期細胞を同定することが行われてきた。近年、thymidineのanalogueであるBrdUが、同様にDNA内に取り込まれることを利用し、免疫組織化学的にS期細胞を同定することが行われている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。口腔領域の実験腫瘍においても、BrdU標識率による細胞増殖動態の解析が多く試みられている⁶¹⁻⁶⁵⁾。

本実験では、1～3週の発癌初期における顎下腺のBrdU標識率をみると、集合管および介在部導管の標識率が、急激に上昇するのが認められた。次いで、顆粒管の標識率が高い値を示したが、線状部導管・腺房細胞では標識率がやや上昇するにとどまった。このことより、集合管および介在部導管上皮が、増殖活性の高い細胞であることが示唆された。

Chung⁶⁶⁾、Alvers and Sesso⁶⁷⁾は、³H-thymidineを用いたオートラジオグラフィによって、正常ラット顎下腺の成長発育過程におけるS期細胞の標識率を検討し、7週齢までの時期で、介在部の標識率が他の細胞に比して高いことを報告している。今回の実験の対照群の標識率でも、介在部が高い値を示した。このことより、介在部の細胞が、正常唾液腺組織でも、高い分裂能を有するものと思われた。また、集合管は、管腔側の円柱細胞と基底細胞からなり、この基底層に増殖能を有する細胞があるとされている⁶⁸⁾。今回の実験でも、発癌初期において、基底層を中心に標識細胞の増加が観察された。

本実験では、扁平上皮化生をきたした導管上皮が類表皮嚢胞を形成する過程では、上皮全層のBrdU標識率に大きな変化はなかったが、基底層のみのBrdU標識率は上昇した。しかし、腫瘍発生をみる時期に至って、上皮全層でも標識率の上昇がみられた。これは、腫瘍発生に至る段階での、上皮異形成の進展と増殖活性の増加を反映しているものと思われる。嚢胞壁・乳頭状増殖部・扁平上皮癌部・腺癌部のBrdU標識率の比較では、扁平上皮癌部が最も標識率が高く、次いで、乳頭状増殖部、嚢胞壁、腺癌部の順であった。また、同じ扁平上皮癌部でも、角化を伴わない比較的低下した扁平上皮癌部ではBrdU標識率が高かった。腺癌部では、標識率は比較的低下したが、これは、腺癌では発育が緩慢であることが示唆される所見であると思われる。

悪性腫瘍の臨床材料の検討や、動物の発癌実験では、組織学的悪性度とS期細胞の標識率の相関が報告されている^{44-46,63,69)}。今回の実験でも、組織学的に悪性と思われるものほどBrdU標識率が高くなる傾向が認められた。

4. ケラチンの局在について

上皮組織におけるケラチンの発現形式は、上

皮の種類や部位、発生段階により異なるばかりでなく、腫瘍化することによって変化し、また、腫瘍の性格によっても差違が認められる^{28-31,34-36}。また、動物種によっても多様性が認められるという多くの報告がある^{35,70-73}。

Mollら²⁸は、ヒトケラチンを19のサブクラスに分類し、ヒトの上皮組織とその腫瘍におけるケラチン分布について述べ、Cooperら³¹も同様の研究を行い、単層上皮、重層扁平上皮、およびその腫瘍などのケラチン発現様式の違いを明らかにしている。口腔領域では、ヒト口腔扁平上皮癌についてケラチン分布の変化が報告されており⁷⁴⁻⁷⁶、ヒト唾液腺およびその腫瘍についても、ケラチン分布に関する免疫組織化学的研究がなされている^{35,36,77}。

本実験では、抗ウシケラチンウサギポリクローナル抗体Z622（ヒトでは、60, 58, 56, 52, 51, 48KDのケラチンサブユニットを認識）、抗サイトケラチンマウスモノクローナル抗体PKK1（ヒトでは、52.5, 45, 40KDのケラチンサブユニットを認識）、抗サイトケラチンマウスモノクローナル抗体KL1（ヒトでは、56KDのケラチンサブユニットを認識）を用い、腫瘍発生過程におけるケラチン分布とその変化を検索した。

Z622は、低分子量から高分子量の広い範囲にわたるケラチンサブユニットを認識して、上皮組織およびその腫瘍のほとんどの細胞に反応を示し²⁹、PKK1は、主に単層上皮に発現する低分子量のケラチンサブユニットを認識して、ヒト重層扁平上皮では基底層のみに反応することが知られている^{26,27,29}。KL1は、ヒトでは主に重層扁平上皮に発現し、基底層を除いた上皮上層に発現するとされている^{26,27,29}。

ヒト正常唾液腺では、PKK1は集合管および線条部導管に陽性、KL1は集合管、線条部導管、介在部導管に陽性で、腺房細胞に弱陽性であったという報告がある³⁶。今回の実験のラット正

常顎下組織では、Z622は、集合管・線条部導管・顆粒管・介在部導管・腺房細胞・筋上皮細胞に陽性で、特に、集合管の基底層と介在部導管に強い反応を示したが、顆粒管および腺房細胞での反応は比較的弱かった。PKK1は、介在部導管と集合管の管腔側の細胞に特に強い陽性像を呈し、線条部導管・顆粒管・腺房細胞にも弱い陽性像を認める場合と陰性の場合があり、その反応性は一定せず、導管系の細胞では、ほとんど陽性像は認められなかった。これらの結果は、ヒト正常唾液腺の反応と異なるが、Murse⁷³は、口腔粘膜上皮で、PKK1・KL1の反応性が動物種により著しく異なることを報告しており、ヒトとラットの唾液腺で差違があっても不思議ではないと思われる。

さて、本実験の発癌過程および発生腫瘍においては、Z622は上皮細胞全てに明瞭な陽性像を呈し、とくに増殖能の高い集合管基底層、介在部導管および腫瘍の浸潤先端部に強い陽性像を呈して、これらの分布と形態を明瞭に観察することができた。Z622による染色像では、発癌初期のペレット近傍の壊死組織中に、強い陽性像を示す介在部類似の小導管が多数観察され、扁平上皮化生をきたした小導管が、ペレットに最も近い部位に存在した。これは、ペレットの近くにある残存導管がDMBAの作用を強く受け、増殖した結果と考えられた。

ペレット付近の壊死層中に残存した小導管は、PKK1陽性であったが、正常顎下腺でPKK1が明瞭な陽性像を示すのは、集合管を除くと介在部導管のみであることから、この小導管は介在部である可能性が示唆された。また、この小導管は、次第にPKK1による染色性が低下し、扁平上皮化生をきたすに至って陰性化した。

PKK1は扁平上皮化生をきたした導管で陰性であるのに対し、KL1が陽性に転じたことは興味深い。形成された類表皮嚢胞では、角化亢進を示す肥厚した上皮の基底層を除く上皮上層で

KL1の陽性所見が認められた。嚢胞壁には、角化を欠き、1ないし数層の細胞からなる、一見拡張した導管を思わせる部分も認められるが、この部では、PKK1は内腔側で陽性であった。発生した腫瘍でも、KL1は角化を伴う高分化型扁平上皮癌の像を定する部分に、PKK1は管腔形成を伴った腺癌の部分に陽性像を示した。これらの所見から、ラット顎下腺の発癌過程では、KL1は重層扁平上皮の性格の獲得した部分に、PKK1は導管上皮の性格を持つ部分に発現することが多いものと考えられた。しかし、KL1とPKK1では、低分化な癌胞巢の浸潤先端部で陰性ないし散在性に陽性細胞を認めるのみであることが多かった。これは、悪性化の進展に伴ってケラチンの発現形式が変化したものと思われるが、逆にZ622では浸潤先端部での染色性は強くなったことが注目される。すなわち、本実験の結果では、Z622は、集合管基底層・介在部導管・腫瘍の浸潤先端部の増殖能の高い細胞でとくに強い陽性像を呈したからである。

5. S-100蛋白の局在について

S-100蛋白は、 $\alpha \cdot \beta$ のサブユニットより成り、神経組織に特異な蛋白抗原として知られ、グリア細胞や神経鞘細胞などに存在するとされている^{31,32)}。現在では、軟骨細胞、ランゲルハンス細胞、悪性黒色腫などにもその局在が証明され、唾液腺腫瘍でも陽性例が報告されている^{34-42,78,79)}。ヒト唾液腺においては、筋上皮細胞に陽性で、腺上皮は陰性であったという報告³⁷⁾、筋上皮と導管上皮の双方に陽性であったという報告^{38,39)}、筋上皮は陰性で、導管上皮は弱陽性を示すという報告⁴⁰⁾などがあり、一致をみていない。

Molinら⁷⁸⁾は、ラットにおいて $\alpha \cdot \beta$ 両サブユニットに対する抗体を作製し、それぞれの局在を免疫組織化学的に検索したところ、 α サブユニットは線条部導管・顆粒管に、 β サブユニットは介在部導管に認められ、筋上皮細胞には両者と

も認められなかったと報告している。また、森村⁷⁹⁾は、ラットの集合管・線条部導管・顆粒管・介在部導管・筋上皮細胞にS-100蛋白の局在が認められたと述べている。抗S-100蛋白抗体Z311は、 $\alpha \cdot \beta$ の両サブユニットを認識し、今回の実験では、集合管・線条部導管に陽性、顆粒管に弱陽性で、介在部では弱陽性と陰性の部分が混在していたが、筋上皮細胞は陰性であり、Molinら⁷⁸⁾の結果を支持する形となった。

今回の発癌実験においては、S-100蛋白は、ペレット周囲の壊死組織中に残存した小導管で陰性ないし弱陽性で、これは、正常顎下腺の介在部の染色態度と一致していた。また、顆粒管が脱顆粒をきたして生じたと思われる、比較的大きな導管構造では、逆にS-100蛋白の染色性は増しており、この構造は、比較的ペレットから離れた部分に存在するものが多かった。腫瘍発生過程にみられる扁平上皮化生をきたした導管では、S-100蛋白陽性の部分と陰性の部分が混在していた。しかし、類表皮嚢胞を形成する上皮では角化の亢進のみられる部分で、また、扁平上皮癌部では、高分化型の部分で陽性像を呈するものが多かった。

一般に、S-100蛋白陽性を示す腫瘍は、その由来細胞がS-100蛋白を産生するものに限られ、腫瘍化によって新たにS-100蛋白を発現することはほとんどないという意見がある³²⁾。著者の実験では、正常顎下腺の導管系の細胞は、全て多少なりともS-100蛋白を有している所見が得られ、発生腫瘍が導管系の細胞由来であることを支持する結果となった。また、これまでの報告では、腫瘍の悪性化の進展に伴ってS-100蛋白の染色性が低下するとされ、本実験でも低分化型の部分では陰性であることが多かった。

6. 腫瘍の組織由来について

実験的唾液腺腫瘍の組織由来について、Steiner²⁰⁾、Cataldoら²¹⁾、Kimら²²⁾は、導管上皮のみならず、腺房細胞の腫瘍参加も否定できな

いとし、Bauer and Byrne¹²⁾は介在部導管、Standish¹⁵⁾、Sugimura¹⁴⁾は線条部導管の細胞にその起源を求めた。また、Wigley and Carbonell¹⁶⁾、Moriら¹⁹⁾、Takaiら^{17,18)}は、顆粒管がその発生母地という見解をとっている。さらに、筋上皮細胞の関与を示唆した報告もある¹²⁾。

ラット・マウスなど齧歯類の顎下腺では、線状部の末端に分泌顆粒を有した顆粒管がある。顆粒管は線状部の一部と考えられているが、これが一次介在部に連なり、一次介在部は分岐して腺房に連なる二次介在部となる。発生学的にみると、未分化導管枝の末端にある細胞集塊のうち、腺房細胞を発生させた残遺が二次介在部であり、その近位にあって、顆粒管を発生させた残遺が一次介在部とされている⁸⁰⁾。したがって、介在部導管細胞は、潜在的増殖能を持っているとされ⁸⁰⁾、発育段階ではS期細胞標識率が常に高いことが報告されている^{66,67)}。また、集合管の基底層にも増殖能の高い細胞が含まれている。集合管上皮中には、何らかの刺激が加わると、粘液細胞や扁平上皮細胞が出現しうるとされており、分化増殖能を有する未分化な細胞(予備細胞ないし幹細胞)が含まれているといわれている⁶⁸⁾。集合管の基底層に含まれる予備細胞が、集合管や小葉内外の太い導管の再生に関与しているのと同様に、介在部導管細胞も予備細胞と考えられており、末端の腺房導管複合体の再生に関与している^{68,80)}。

本実験では、発癌過程の初期から、この集合管基底層と介在部導管のBrdU標識率の著明な上昇があり、発生した腫瘍のこの部からの組織由来が考えられた。病理組織学的にも、集合管の増殖・扁平上皮化生は明らかで、DMBAペレット周囲の壊死組織中に残存した介在部類似の小導管も、扁平上皮化生をきたして増殖し、そしてこれらが類表皮嚢胞の形成を担い、腫瘍の直接の発生の場を提供するものと思われる。生

田⁸⁾、榎本⁹⁾は、壊死組織中の小導管が、介在部かどうか特定できなかったとしているが、今回の実験では発癌初期において、Z622により明瞭に染色される小導管の形態が極めて介在部に類似していること、介在部で強い陽性を示すPKK1がこの小導管でも陽性であったこと、顆粒管の脱顆粒により生じる導管様構造ではS-100蛋白陽性であるのに対し、この小導管では陰性ないし弱陽性であったことなどの結果からも、これが介在部である可能性が示唆された。

以上の結果から、集合管および介在部導管上皮が、腫瘍発生母地として最も可能性が高いと思われた。

また、前述のように、著者の実験で得られた腫瘍は、通例の唾液腺腫瘍の特徴的所見である被膜形成がみられたこと、さらに著者の観察期間では、他臓器への転移がみられなかったことなどに加えて、組織学的にも腺性分化を示す所見が随所に認められた。したがって、本腫瘍は、口腔粘膜上皮由来の癌種とは、明らかに性格が異なるものと思われた。

今後、さらに本実験を発展させ、本腫瘍の特徴をin vivo, in vitroで明らかにしていくとともに、口腔外科臨床に役立てたいと考える。

結 語

1. ラット顎下腺にDMBAペレットを投与することによって、扁平上皮癌の組織像を呈する腫瘍を得たが、一部に明らかな腺腔構造を呈する腺癌の組織像が認められた。

2. 発生した腫瘍は、組織学的には扁平上皮癌が優位を占めるものの、腺性分化の傾向が随所に認められ、口腔粘膜上皮より得られる実験的扁平上皮癌と、その性格を異にするものと思われた。

3. ラット顎下腺腫瘍発生過程における組織像とBrdU標識率の推移から、集合管基底層および発癌初期にペレット周囲に残存した小導管

が扁平上皮化生をきたし、類表皮嚢胞の形成・嚢胞壁の乳頭状増殖を経て、腫瘍が発生するものと思われた。

4. 腫瘍発生過程において、初期にペレット周囲の壊死層内に残存した小導管は、形態的に介在部に類似し、また、ケラチンおよびS-100蛋白の染色態度からも、介在部導管上皮であることが、示唆された。

5. 以上の結果より、分化増殖能を有する集合基底層および介在部導管の細胞が、DMBA誘発ラット顎下腺腫瘍の組織由来として、最も可能性の高いことが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の機会を与えて下さり、終始、懇切丁寧なるご指導、ご校閲を賜りました恩師 金澤正昭教授、ならびに本学口腔病理学講座 賀来 亨教授、口腔解剖学第二講座 武田正子教授に深甚なる謝意を表しますとともに、多大なるご協力をいただきました口腔外科学教室員各位に、深く感謝致します。

本論文の要旨の一部は、第36回日本口腔外科学会総会(平成3年10月4日 大阪)、第46回日本口腔科学学会総会(平成4年4月18日 名古屋)において発表した。

文 献

- 1) Seifert, G. and Sobin, L.H.: Histological Typing of Salivary Gland Tumours. World Health Organization; International Histological Classification of Tumours, 2nd ed, Springer-Verlag, Berlin, 1991.
- 2) Eneroth, C.M.: Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular gland and the palateregion, *Cancer* 27: 1415-1418, 1971.
- 3) 長尾孝一: 耳下腺腫瘍の病理. 奥田 稔, 金子敏郎 編集; 耳下腺腫瘍—その基礎と臨床—. 第1版, 文光堂, 東京, 1987, 8-43頁.
- 4) 長尾孝一: 唾液腺腫瘍の分類ならびにまれな腫瘍の解説. *病理と臨床*, 7: 560-573, 1989.
- 5) 恒元 博: 耳下腺癌の放射線治療. 奥田 稔, 金子敏郎編集; 耳下腺腫瘍—その基礎と臨床—. 第1版, 文光堂, 東京, 1987, 226-231頁.
- 6) 金子敏郎, 鈴子晴彦: 唾液腺腫瘍の臨床. *病理と臨床* 7: 538-544, 1989.
- 7) 横尾恵美子, 石井純一, 清水正嗣, 塩田重利: 唾液腺原発悪性腫瘍の臨床的研究. *日口外誌*, 28: 75-85, 1982.
- 8) 生田信孝: 顎下腺における実験的腫瘍形成の研究. *口病誌*, 31: 373-386, 1961.
- 9) 榎本昭二: 耳下腺における実験的腫瘍形成の研究. *口病誌*, 31: 201-224, 1964.
- 10) 塩田 覚, 南 英治, 吉武一貞, 小野尊睦: 実験的唾液腺腫瘍に関する研究. *京大口腔科紀*, 18: 28-39, 1978.
- 11) 河原和子, 熊谷克彦, 二階宏昌: 7, 12-DMBAにより誘発されたマウス顎下腺腫瘍—光顕的にみた病理組織像—. *広大歯誌*, 1: 115-124, 1979.
- 12) Bauer, W.H. and Byrne, J.J.: Induced tumors of the parotid gland. *Cancer Res* 10: 755-761, 1950.
- 13) Ashley, M.B.: A comparative assay of the invitro and in-vivo behavior of the chemically induced neoplasm in rat submandibular glands. *J Oral Pathol* 2: 33-45, 1973.
- 14) Sugimura, M.: Histological and enzymatic histo-chemical studies of the tumor during experimental carcinogenesis in the mouse parotid gland. *J Osaka Univ Dent Sch* 6: 1-24, 1966.
- 15) Standish, S.M.: Early histologic changes in induced tumors of the rat. *Am J Pathol* 133: 671-689, 1957.
- 16) Wigley, C.B. and Carbonell, A.W.: The target cell in the chemical induction of carcinomas in mouse submandibular gland. *Europ J Cancer* 12: 737-741, 1976.
- 17) Takai, Y., Murase, N., Hosaka, M., Kawamura, K., and Mori, M.: Immunohistochemical localization of keratin in experimental carcinoma of the mouse submandibular gland. *J Oral Pathol* 15: 5-10, 1986.
- 18) Takai, Y., Murase, N., Hosaka, M., Kawamura, K., and Mori, M.: Keratin distribution in precancerous stages of experimental carcinogenesis in mouse submandibular glands. *Virchows Arch B Cell Pathol* 47: 183-187, 1984.
- 19) Mori, M., Takai, Y., Naito, R., Hosaka, M., and murase, N.: Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor and nerve growth factor in experimental carcinogenesis in the mouse submandibular

- gland. *Virchows Arch Path* 34 :613-624, 1942.
- 20) Steiner, P.E. : Comparative pathology of induced tumors of the salivary glands, *Arch Path* 34: 613-624, 1942.
- 21) Cataldo, E., Shklar, G., and Chauncey, H. H. : Experimental submaxillary gland tumors in rats. *Arch Path* 77: 305-316, 1964.
- 22) Kim, S., Spencer, H.H., Weatherbee, L., and Nasjileti, E. : Changes in secretory cells during early stages of experimental carcinogenesis in the rat submandibular gland. *Cancer Res* 34: 2172-2183, 1974.
- 23) Shafer, W.G. : Experimental salivary gland tumorigenesis. *J Dent Res* 41: 117-124, 1962.
- 24) 片瀬秀士 : 実験的唾液腺腫瘍の発生とその増殖能に関する蛍光組織化学的研究. *神奈川歯学*, 19: 169-198, 1984.
- 25) Watanabe, Y., Ozono, S., Sato, K., Hisada, T., and Hetden, G. : The application of micro-spectrocyto-fluorometric measurement of Feulgen nuclear DNA content to experimental tumors of rat submandibular gland. 1. Pathogenesis and nuclear DNA content. *J Oral Pathol*, 16: 1-7, 1987.
- 26) 堤 寛 : 腫瘍マーカーの免疫組織化学. *臨床検査*, 31: 1034-1046, 1987.
- 27) 堤 寛 : モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学とその病理診断への応用. *細胞*, 18: 322-328, 1986.
- 28) Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., and Krepler, R. : The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. *Cell* 31: 11-24, 1982.
- 29) 堤 寛 : 病理学への応用 : ケラチン, デスミン, ビメンチン. *病理と臨床*, 5: 445-461, 1987.
- 30) 森永正二郎, 中島 孝, 下里幸雄 : 中間フィラメント. *病理と臨床*, 5: 385-394, 1987.
- 31) Cooper, D., Schermer, A., and Sun, T.T. : Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: Strategies, applications and limitations. *Lab Invest* 52: 243-256, 1983.
- 32) 中島 孝 : 神経組織抗原の免疫組織化学への応用. *病理と臨床*, 2: 1569-1574, 1984.
- 33) 中島 孝, 石原和之 : S-100蛋白, 皮膚臨床, 28: 1081-1088, 1986.
- 34) 森永正二郎 : 耳下腺腫瘍の免疫組織化学—とくに筋上皮細胞の関与する腫瘍について—. 奥田 稔, 佳菜子敏郎編集 ; 耳下腺腫瘍—その基礎と臨床—. 第1版 文光堂, 東京, 1987, 67-86頁.
- 35) 甲村雄二 : 大唾液腺, 多形性腺腫の免疫組織化学的検討—特に組織発生についての検討—. *日口外誌*, 31: 2561-2574, 1985.
- 36) 風岡宜暁 : 唾液腺腺癌の免疫組織化学的研究—特に組織発生について—. *日口外誌*, 31: 2561-2574, 1985.
- 37) Hara, K., Ito, M., Takeuchi, J., Iijima, S., Endo, T., and Hidaka, H. : Distribution of S-100b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. *Virchows Arch A Pathol Anat* 401: 237-249, 1983.
- 38) Regezi, J.A., Lloyd R.V., Zarbo, R.J., and McClatchey, K.D. : Minor salivary gland tumors. A histologic and immunohistochemical study. *Cancer* 55: 108-115, 1985.
- 39) Erlandson, R.A., Cardon-Cardo, C., and Higgins, P.J. : Histogenesis of benign pleomorphic adenoma (mixed tumor) of the major salivary glands. An ultrastructural and immuno-histochemical study. *Am J Surg Pathol* 8 :803-820, 1984.
- 40) Nakazato, Y., Ishizeki, J., Takahashi, K., Yamaguchi, H., Kamei, T., and Mori, T. : Localization of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein related antigen in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Lab Invest* 46: 621-626, 1982.
- 41) 浜川裕之, 土井 正, 兵頭いづみ, 森 恵造, 谷岡博昭 : ヒト唾液腺腫瘍の免疫組織化学的研究. *日口外誌*, 32: 1109-1117, 1986.
- 42) Zarbo, R.J., Regezi, J.A., and Batsakis, J. G. : S-100 protein in salivary gland tumors: an immunohistochemical study of 129 cases *Head Neck Surg* 8: 268-275, 1986.
- 43) 多田利彦, 児玉哲郎, 渡辺 昌, 下里幸雄 : BrdU (Bromodeoxyuridine) モノクローナル抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討とその臨床応用. *医学のあゆみ*, 135: 510-513, 1985.
- 44) 佐々木功典, 荻野哲郎, 村上知之, 高橋 学 : モノクローナル抗BrdUrd抗体を利用した人癌組織の標識率測定法. *病理と臨床*, 3: 565-567, 1985.
- 45) 星野孝夫 : 脳腫瘍の細胞増殖能について. *病理と臨床*, 9: 620-627, 1991.

- 46) 菊山成博：Bromodeoxyuridineおよび免疫組織化学手法を用いたヒト癌細胞動態の基礎的、臨床的研究。日外会誌, 90: 355-363, 1989.
- 47) 伊東信行, 立松正衛：化学的発癌の寄与するもの—癌の疾患モデルとは何か—。蛋白質 核酸 酵素, 23: 467-479, 1978.
- 48) 領家と男, 斉藤鉄郎, 岡本和己, 道田章仁, 吉田浩紀, 濱田 駿：唾液腺腫瘍52例の臨床的検討。日口外誌, 37: 1712-1720, 1991.
- 49) 堀之内康文, 篠原正徳, 左坐春喜, 田代秀雄, 岡 増一郎：唾液腺腫瘍160症例の臨床統計的検索。日口外誌, 36: 1730-1737, 1990.
- 50) 宮田和幸, 森田展雄, 和田 健, 原田昌和, 上裕弘之, 坂本忠幸：唾液腺腫瘍60例の臨床統計的観察。日口外誌, 35: 1514-1521, 1989.
- 51) Shapiro, B.L. and Gorlin, R.J. : A morphologic study of a carcinogenic procedure in the hamster submandibular gland. Arch Oral Biol 9: 141-147, 1964.
- 52) Chaudhry, A.P., Reynolds, D.H., Gorlin, R. J., and Vickers, R.A. : Experimental carcinogenesis in submandibular glands of hamsters. J Dent Res 40: 426-432, 1961.
- 53) Cataldo, E. and Shklar, G. : Chemical carcinogenesis in the hamster submaxillary gland. J Dent Res 44: 568-579, 1964.
- 54) 中島 武：20-Methylcolanthreneによる唾液腺腫瘍発生に関する実験的研究。とくに肉腫型腫瘍について。岩手医誌, 25: 572-588, 1973.
- 55) Chauncey, H.H., Shklar, G. and Quintarelli, G. : Histochemistry of experimentally induced fibrosarcoma in rat submaxillary gland. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 18: 389-398, 1964.
- 56) 細田泰弘, 薬丸一洋：扁平上皮癌と腺癌の組織像が混在した剖検例。手術, 28: 1271-1277, 1974.
- 57) 川上晋一郎, 井口郁雄, 大内 玄, 古川勝朗, 増田游, 青木輝行, 赤木博史, 浜田忠雄：甲状腺 Adenoacanthoma の1例。耳鼻臨床, 78: 1081-1086, 1985.
- 58) 山川純至, 折田洋造, 林 琢巳, 吉弘 剛, 半田 徹, 山本栄一：顎下腺の腺扁平上皮癌例。耳鼻臨床, 85: 937-941, 1992.
- 59) Englander, A. and Cataldi, E. : Experimental carcinogenesis in duct-artery ligated rat submandibular gland. J Dent Res 55: 229-234, 1976.
- 60) Takai, Y., Noda, Y., Sumimoto, S., Hosaka, N., Mori, M. : Immunohistochemical demonstration of keratin proteins in duct-ligated salivary glands of mice and rats, J Oral Pathol 15: 16-20, 1986.
- 61) Kaku, T., Ohuchi, T., Nakade, O., Ogawa. A., Kanno, H., Abe, H., and Okuyama, T. : Patterns of epithelial proliferation revealed by intraperitoneal administration of bromodeoxyuridine during buccal pouch carcinogenesis in hamsters. J Oral Biol 31: 749-752, 1989.
- 62) 賀来 亨, 大内知之, 中出 修, 蓑輪泰子, 関 智香子, 阿部英二, 菅野英俊, 奥山富三, 小川 純：ハムスター口腔癌形成過程における免疫組織化学的研究。第2報：ハムスター頬嚢癌形成過程における上皮細胞増殖とGGT陽性巣。日口外誌, 35 :2253-2259, 1989.
- 63) 小川 純：Nd-YAGレーザーの発癌過程に及ぼす影響について。日口外誌, 35: 2280-2299, 1989.
- 64) 本間義郎, 木下鞆彦, 水谷成孝, 田畑利章, 浅野信雄, 河原健司, 中村昌幸, 志村介三：核DNA, RNA定量と抗BrdU抗体を用いた口腔扁平上皮癌の細胞増殖動態解析。口腔腫瘍, 1: 5-10, 1989.
- 65) 賀来 亨, 中出 修, 八重樫和秀, 大内知之, 蓑輪泰子, 阿部英二, 菅野英俊, 奥山富三：DMBA塗布によるハムスター頬嚢粘膜上皮の細胞増殖とBrdUの結合。東日本歯誌, 6: 45-52, 1987.
- 66) Chung, W.W.L. : Cell population changes during acinus formation in the postnatal rat submandibular gland. Anat Rsc 178: 187-202, 1973.
- 67) Alvares, E.P. and Sesso, A. : Cell proliferation, differentiation and transformation in the rat submandibular gland during early postnatal growth. A quantitative and morphological study. Arch Histol Jap 38: 177-208, 1975.
- 68) 森永正二郎：唾液腺の解剖と腫瘍の組織発生。病理と臨床, 7: 545-559, 1989.
- 69) 小坂健夫, 伊井 徹, 鎌田 徹, 竹川 茂, 大山茂和, 神野正博, 山口明夫, 米村 豊, 三輪晃一, 宮崎逸夫：DNA/BrdU二重染色法を用いた大腸腺腫症例の細胞回転の検討。癌の臨床, 36: 2141-2145, 1990.
- 70) 福井 伸：ハムスター頬嚢粘膜の前癌病変における形態変化とケラチンの分布および³H-Thymidineの取込み。日口外誌, 35 :2832-2847, 1989.
- 71) 末廣達成：ハムスター口腔癌形成過程における免疫組織化学的研究—口腔癌形成過程におけるケラチンの

- 局在とレクチンの結合性について一。日口外誌, 38: 405-423, 1992.
- 72) 安田元昭：実験的舌癌の免疫組織学的研究。口科誌, 41: 213-233, 1992.
- 73) Murase, N., Fukui, S., and Mori, M. : Heterogeneity of Keratin distribution in the oral mucosa and skin of mammals as determined using monoclonal antibodies. *Histochemistry* 85: 265-276, 1986.
- 74) Makai, M. and Mori, M. : Immunohistochemical distribution of monoclonal antibodies against keratin in papillomas and carcinomas from oral and nasopharyngeal regions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 62: 292-302, 1986.
- 75) 中井道明：扁平上皮由来腫瘍における細胞骨格成分の免疫組織化学的研究。日口外誌, 31: 2575-2594, 1985.
- 76) Mori, M., Nakai, M., Hyun, K.H., Noda, Y., and Kawamura, K. : Distribution of keratin proteins in neoplastic and tumorlike lesions of squamous epithelium. An immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 59: 63-69, 1985.
- 77) Berns, B.F., Dardick, I., and Parks, W.R. : Intermediate filament expression in normal parotid glands and pleomorphic adenomas. *Virchows Arch A Pathol Anat* 413: 103-112, 1988.
- 78) Molin, S.O., Rosengren, L., Haglid, K., Baudier, J., and Hamberger, A. : Differential localization of "brain-specific" S-100 and its subunits in rat salivary glands. *J Histochem* 32: 805-814, 1984.
- 79) 森村 葵：ラット顎下腺再生実験における免疫組織化学的研究。歯科学報, 88: 511-528, 1988.
- 80) 山科正平：耳下腺組織発生。奥田 稔, 金子敏郎編集；耳下腺腫瘍－その基礎と臨床－。第1版, 文光堂, 東京, 1987, 2-7頁。