

下咽頭扁平上皮癌のレクチン組織化学的研究

阿 部 和 也

下咽頭扁平上皮癌のレクチン組織化学的研究

阿 部 和 也

目 次

A. 緒言	...	1
B. 材料および方法	...	3
B.1. 光顕観察	...	3
B.1.1. 対象症例	...	3
B.1.2. 臨床的因子	...	3
B.1.3. 切片処理	...	3
B.1.4. 統計的検討	...	4
B.2. 電顕観察	...	4
B.2.1. 対象症例	...	4
B.2.2. 切片処理	...	4
C. 結果	...	5
C.1. 光顕観察	...	5
C.1.1. 臨床的因子	...	5
C.1.2. 正常組織におけるレクチン反応	...	5
C.1.3. 腫瘍組織におけるレクチン反応	...	6
C.2. 臨床的因子との関連性	...	7
C.3. 電顕観察	...	7
C.3.1. 正常組織におけるレクチン結合パターン	...	7
C.3.2. 腫瘍組織におけるレクチン結合パターン	...	7
D. 考察	...	9
D.1. 所見のまとめ	...	9
D.2. 所見の解釈	...	9
D.3. 他の頭頸部領域における扁平上皮癌組織との比較	...	10
D.4. 今後の課題	...	11
E. まとめ	...	11
文献	...	13
表	...	21
図	...	30

A. 緒言

頭頸部領域では、悪性腫瘍の大部分を扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma; SCC) が占め、下咽頭では約95%が扁平上皮癌である。下咽頭癌は頭頸部癌のうちでは比較的低頻度 (約8%) であるが、予後は今なお最も不良で、5年生存率は高々30%である (宮原, 1986)。自覚症状は多彩であるが、いずれも出現が遅いため進展例が多く、診断が他の部位に比較して困難であり、重要で精細な器官・臓器が密集する頭頸部では拡大手術が困難であることなどが予後不良の理由と考えられる。発癌要因として飲酒と喫煙が挙げられるが、女性の飲酒・喫煙が増加している現状では将来女性の下咽頭癌が増加するおそれもある。

頭頸部腫瘍でも、その発生や性質を遺伝子の面から解析する研究が、近年甚だ活発で、例えば癌抑制遺伝子p53に代表される遺伝子や human papilloma virus などのウイルスDNAをPCR-SSCP法を用いて検出したり (Chiba, I., *et al.*, 1996)、遺伝子から導かれるp53やp21などの蛋白質を免疫組織化学的に検出するなどの試みが行なわれている。

一方、細胞や組織を構成する複合糖質は生体内で重要な機能を担い、その果たす役割が注目されている。これら複合糖質は、細胞内の情報伝達系の最終産物として、細胞内外での現象の実現に直接与る物質であり、細胞間認識や接着をはじめ、分化、増殖、悪性化、腫瘍の転移等に関わっているとされる (神奈木, 1994)。しかしながら、複合糖質はその構造を遺伝子からは直接規定されず、構造の制御は専ら糖転移酵素などを介する間接的なレベルである。従って、複合糖質が関与する様々な現象を理解する上で、*in situ*での複合糖質自体の局在やその動的变化を組織細胞化学的に検索することが、大きな意義を持つと考えられる。

複合糖質の組織化学的解析には、糖鎖抗体法と並んで、レクチン法が広く用いられている。周知のように、レクチンは糖特異性を持つ非免疫原性の蛋白質で、蛍光色素、コロイド金、フェリチン、あるいはペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRP) などで標識してプローブとして用いることにより、複合糖質糖鎖構造の分布と性状を *in situ* で光顕的、あるいは電顕的に厳密に検討することが可能である。実際にレクチンを用いて、複合糖質の関与が、分化 (Kawai, *et al.*, 1979; Brabec, *et al.*, 1980; Rosati, *et al.*, 1980; Zieske, *et al.*, 1982; Nemanic, *et al.*, 1983; Takata, *et al.*, 1983)、

悪性化 (Warren, *et al.*, 1978; Hirano, 1980; Howard, *et al.*, 1980; Yonezawa, *et al.*, 1983; Hyun, *et al.*, 1984; Yamashita, *et al.*, 1984; Ookusa, *et al.*, 1985; Pierce, *et al.*, 1986; Nogami, *et al.*, 1988)、癌転移 (Humphries, *et al.*, 1986; Dennis, *et al.*, 1987; Kawakami, *et al.*, 1992; Kawakami, *et al.*, 1994) などにおいて明かにされている。さらに、特定のレクチンの結合性が癌化に際し特徴的な変化を示す現象も報告されている。例えば、DBAと乳房外Paget病 (Ookusa, *et al.*, 1985)、DBA、WGA、UEA-IとCEA陽性の肝癌 (Machinami, *et al.*, 1987)、UEA-Iと食道癌 (Nogami, *et al.*, 1988)、ConAと膀胱上皮 (Yokoyama, *et al.*, 1988)、UEA-I、PNAと子宮腺癌 (Aoki, *et al.*, 1990)、PNAと皮膚扁平上皮癌 (Kannon and Park, 1990) 等の組み合わせで、染色パターンの変化の報告がある。

上述の様に、下咽頭以外の領域においては糖鎖の研究が盛んに為されており、成果も得られているが、下咽頭および下咽頭癌に対する糖鎖の研究は、文献を渉猟し得た範囲では極めて少ない。本研究では、下咽頭癌における糖鎖の性状の変化および腫瘍の分化度に代表される悪性度との関連を明かにすべく、HRP 標識レクチン法を用い、光顕および電顕レベルで検索した。

B. 材料および方法

B.1. 光顕観察

B.1.1. 対象症例

東京大学医学部附属病院病理部で下咽頭扁平上皮癌と診断され、同院耳鼻咽喉科において1986年1月から1992年12月までの7年間に手術を施行した症例のうち、36症例（男：女＝28：8、平均年齢60.2歳）の病理組織標本を用いた。症例の選択に当たっては、十分な大きさをもち、病巣周辺部に病理組織学的に正常と診断された粘膜を含む標本を優先的に採択した。扁平上皮癌と比較するための正常組織として、標本の辺縁に近く位置し、壊死や腫瘍の浸潤を伴わない部位の粘膜を用いた。

B.1.2. 臨床的因子

入院時の病歴の記録より、l'Union International Contre le Cancer (UICC) の規準 (UICC, 1987) によるTNM分類、ABO式血液型を調査した。また、その後の記録より患者の予後についても調査した。さらに、H&E染色標本により頭頸部癌取扱い規約 (日本頭頸部腫瘍学会, 1982) およびWHOの規準 (Shanmugaratnam, *et al.*, 1991) に基づいて各症例の扁平上皮癌組織を高分化型、中分化型、低分化型に分類した。

B.1.3. 切片処理

組織片を10%ホルマリンで1昼夜固定し、必要に応じて脱灰処理を施した後、パラフィン切片 (4 μ m) を作製した。脱パラフィン後、切片を1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, 以下BSA) - 0.01M PBS (phosphate-buffered saline, pH7.2) で10分間前処理し、PBSにより洗滌、各種ビオチン化レクチン (25 μ g/ml, Vector Lab., CA, USA. 0.1%のBSA加PBSにて希釈) と30分間反応した。次いでPBSにて充分洗滌後、ABC液 (avidin-biotinyl peroxidase complex, Vectastain ABC キット, Vector Laboratories, Inc., USA) と30分間反応し、再びPBSで洗滌した。3,3'-diaminobenzidine \cdot 4 HCl (DAB; 0.2 mg/ml) - 0.005% H_2O_2 と室温で10分間反応後、純水により洗滌、必要に応じて核染色、脱水、封入後、光学顕微鏡下にて観察した (表2)。以上の反応は全過程を室温で行なった。

対照実験として、各レクチンの糖特異性を確認するため、一部の切片を阻害糖 (0.1 M) とあらかじめ反応させたうえ、阻害糖の存在下でビオチン化レクチンと反応

させた(表2)。使用した阻害糖を表1に示す。

非特異的なABC結合の有無を検出するため、一部の切片をABC試薬と反応させた後にDAB-H₂O₂に浸漬した。更に内因性ペルオキシダーゼ活性の有無を検討するため、別の切片をDAB-H₂O₂のみと反応させた。

レクチン反応は、陽性反応の認められる細胞の出現頻度(incidence、以下頻度)と陽性反応の反応強度(intensity、以下強度)により分類した。陽性反応細胞の「頻度」は、100-50%、50-10%、10%以下、0%(反応陰性)の4段階に分類した。陽性反応の「強度」は、強、中等度、弱、無(反応陰性)の4段階に分類した。

B.1.4.統計的検討

レクチン反応の頻度および強度と、TNM分類、ABO式血液型、腫瘍分化度、患者の予後との関連を、統計学的に検討した。頻度および強度は、各段階を3(頻度:100-50%、強度:強)から0(頻度:0%、強度:反応陰性)に点数化し、各群間で分散分析法を用いて評価した。

B.2.電顕観察

B.2.1.対象症例

下咽頭腫瘍摘出術を受け病理組織学的に扁平上皮癌と診断された6例(男:女=5:1、平均年齢63.1歳、1988年~1990年、東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科2例、武蔵野赤十字病院耳鼻咽喉科4例)から得られた切除組織を電顕観察に供した。扁平上皮癌以外の腫瘍手術時に得た正常粘膜標本2例を正常対照標本とした。

B.2.2.切片処理

標本を2.5%グルタルアルデヒド-PB(0.1M phosphate buffer, pH7.4)で4℃、4時間固定後、PBSで洗滌、厚切凍結切片(50μm)を作製した。HRP標識レクチン(100μg/ml, E. Y. Lab., CA, USA)と4℃にて72時間反応後、PBSで洗滌、0.2 mg/ml DAB-0.005% H₂O₂溶液内に15分間浸漬し、蒸留水で洗滌、1% 四酸化オスミウムにて1時間後固定、脱水後エボン812に包埋した。超薄切片作製後、クエン酸鉛で後染色し、透過型電子顕微鏡(JEM-1200 EX, 加速電圧:80kV)下にて観察した(表3)。

C. 結果

C.1. 光顕観察

C.1.1. 臨床的因子

症例の内訳を表4に示す。平均年齢、男女比では男性に圧倒的に多いこと、及びUICCによるTNM分類ではT3以上と進行症例が多いこと(表4-1)のいずれもが典型的と判断される。また、TNM分類でT0症例及びM0症例が多数を占める(表4-2、4-3)ことから、疾患を放置したために進行例となったのではないことが推察される。

ABO式血液型では、特定の血液型への偏りを認めなかった(表4-4)。

H&E染色標本により分化度を再検討した結果、高分化型が3分の2、中分化型が3分の1を占め、低分化型の症例はなかった(表4-5)。

C.1.2. 正常組織におけるレクチン反応

下咽頭を覆う上皮は、非角化重層扁平上皮で、基底膜上より表層に向かって、1層の細胞からなる基底層、厚い有棘層、数層の扁平細胞からなる角質層に分けられる(図1)。正常上皮では、全てのレクチンがそれぞれに特徴的な結合パターンを示した。レクチン結合は主として細胞膜に検出され、重層扁平上皮の各層により強度を異にした。特に、有棘層においては、その浅層と深層とで異なるレクチン結合パターンを示すことが見られた。生検によって得られた正常重層扁平上皮と、手術標本で腫瘍周囲に見られた正常上皮との間には、レクチン結合パターンに差異が見られなかった。脱灰標本と非脱灰標本の間にも差異は認められなかった。以下に各レクチンの結合パターンを述べる。

ConA 反応は、組織全体に一樣に陽性であった(図2)。WGA 反応は、上皮全層および粘膜下組織に一樣に見られたが、とりわけ上皮表層で強い反応を呈した(図3)。PNA 反応は、上皮有棘層に見られ、特に有棘層深部で反応が増強していた。PNA 反応は、上皮表層では見られず、一方、基底膜に接する基底細胞では反応が減弱し、基底細胞の上層の有棘層細胞に見られる強い陽性反応と好対照をなした(図4)。SBA 反応は、有棘層において最も強かった。有棘層の上部で強いSBA 反応が見られ、基底層および基底層に接する下部有棘層では反応が見られなかった(図5)。VVA(図6)、GS-1(図7)およびSJA(図8)は、SBAと同様な反応パター

ンを示し、上皮表層で最も強い反応を呈した。反応強度は、深部に向かうに従って減弱し、基底層では反応は消失した。ただし、SBAと比較して反応の強度はVVAの方が強く、SJAの方が弱かった。なお、UEA-Iは反応陰性の症例がほとんどであった。

対照実験では、各レクチンとも、表1に示したハプテン糖の添加によって反応が抑制された。例としてSJA反応における対照実験の光顕像を示す(図9)。表1の全てのレクチンにおいて結合反応の糖特異性が確認された。非特異反応は認められなかった。

各レクチンの反応パターンは大きく3つの群に分類される。ConA、WGAは全層に亘り陽性反応が見られた。SBA、VVA、GS-IおよびSJAでは、有棘層および表層において陽性反応が見られ、基底層では反応陰性であった。PNAは、上の2群と異なり、有棘層深部で強い陽性反応が見られ、一方、基底膜に接する基底細胞では反応が減弱した。PNA反応性と上皮細胞の分化度との間の関連が示唆される。図10に上述した各レクチンの反応パターンをまとめて模式図に示す。

C.1.3. 腫瘍組織におけるレクチン反応

図11、12に腫瘍組織の光顕像(H&E染色)を示す。この症例は高分化型扁平上皮癌で、核異型性の強い細胞が巣状に増殖し角化傾向も強い。以下、レクチン反応の光顕像は、上記H&E染色を施したのと同じの包埋標本でかつ近接切片を染色した像である。

ConAを除く各々のレクチン反応は細胞膜にほぼ限局して検出された。高分化型扁平上皮癌で細胞間橋が形成されているような症例では、ConA、WGA、PNA、SBA、VVAレクチン反応は強陽性であった。

ConA反応は、腫瘍細胞、間質細胞のいずれにも一様に見られた(図13)。細胞膜のみならず細胞質にも強い陽性反応が見られた。WGAでも、切片標本全域に亘り、腫瘍細胞、間質細胞のいずれにも一様な強い反応が観察されたが、反応は細胞膜に限局する傾向にあった(図14)。PNA反応は、癌組織の分化度により異なる所見が得られた。高分化型扁平上皮癌では頻度・強度とも強い症例が多く見られた(図15、表5-1、5-1a)。そのうち約3分の1の症例では、反応の弱い正常組織の中に、強い反応を示す腫瘍組織が散在していた。中分化型扁平上皮癌においては、PNA反応は、頻度・強度とも強い症例は見られず、陽性反応が見られない症例が比較的多く

見られた(表5-1b)。図20~22に示す症例は図11~19とは別の中分化型扁平上皮癌症例である。癌組織のH&E染色光顕写真(図20;弱拡大,図21;強拡大)とPNA染色写真(図22)を示す。PNA反応は陰性である。

SBA反応は扁平上皮癌組織ではかなり強く、周囲の正常組織とは明瞭に対比をなす症例が多数見られた(図16,表5-2)。VVA反応は、全ての標本で強い反応が腫瘍細胞に検出された(図17,表5-3)。GS-1反応は、弱い症例が大多数を占めた(図18)。SJA反応も弱い症例が大多数を占めた(図19,表5-4)。なお、UEA-iは正常組織と同様、反応陰性の症例がほとんどであった。

C.2.臨床的因子との関連性

分散分析により、ABO式血液型、TNM分類、患者の予後とレクチン結合性とはには相関が認められなかった。扁平上皮癌の分化度とレクチン結合性とは、PNA結合性のみが分化度と関連し、分化度が低くなると染色性が低下する所見が得られたが、分散分析による評価では、結合強度、結合頻度のいずれの観点からも相関(強度; $p < 0.01$, 頻度; $p < 0.05$)が確認された(表6)。

C.3.電顕観察

C.3.1.正常組織におけるレクチン結合パターン

WGA、PNA、SBAの各レクチンでは、光顕所見に対応した結果が電顕レベルでも認められた。WGAは、上皮表層で細胞膜に強い陽性反応を呈したが、深層における反応は表層より弱かった。陽性反応は細胞膜とゴルジ膜に見られ、核膜、小胞体には検出されなかった(図23、24)。PNAは、基底層に接する有棘層深部の細胞で強い反応を示した。反応は細胞膜に主に見られ、核膜、小胞体には認められなかった。ゴルジ膜はtrans領域のみで非常に弱い陽性反応を示した(図25、26)。SBAは、上部有棘層で強い反応を呈した。陽性反応は細胞膜に局限し、ゴルジ領域、小胞体、核膜には反応が見られなかった(図27、28)。

C.3.2.腫瘍組織におけるレクチン結合パターン

WGA、PNAおよびSBAは細胞膜に結合反応を示した(図29、30、31)。細胞膜の嵌合している部位ではより強い陽性反応が見られた。正常組織とは異なり、各レク

チンでゴルジ層板の全層に互って陽性反応を示した。核膜、小胞体には反応が認められなかった。

D. 考察

D.1. 所見のまとめ

正常重層扁平上皮では、各レクチンは上皮の層構造に対応してそれぞれ異なる染色性を示した。腫瘍組織では染色性の異なる細胞が集塊をなす傾向にあった。

レクチンにより、正常組織と腫瘍組織とで異なる染色性を示したが、とりわけ、PNA、VVA および SBA の結合パターンは、正常組織では上皮の層に一致して陽性反応が見られるのに対し、腫瘍組織では腫瘍細胞全体に陽性反応が見られ、際立った特徴を示した。中でも PNA では反応強度・頻度と腫瘍の分化度とが正の相関を示し、PNA 反応が腫瘍分化度の指標として有用であると考えられる。

レクチンの反応部位は、電顕的には主として細胞膜及びゴルジ膜に一致して認められた。正常組織では PNA 反応が *trans* 側のゴルジ層板に観察されたのに対し、腫瘍組織ではゴルジ層板全層に亘って認められた。頭頸部の扁平上皮癌に関して、レクチンを使用した研究はいくつかあるが、いずれも光顕レベルに限られ、本研究により下咽頭癌組織が電顕的に、しかもサブオルガネラ・レベルで検索されたことの意義は大きい。

D.2. 所見の解釈

正常下咽頭の重層扁平上皮では、各層構造に対応したレクチン染色性の変化が観察されたが、上皮では、それぞれの層に存在する細胞の分化度に対応している。すなわち、最下層の基底層には、比較的未分化な細胞が並び、その細胞が分裂して分化し、デスモゾームが発達して有棘層細胞となる。有棘層細胞は表層に移動するにつれ細胞内にケラチンを蓄積し、角質層を形成し、最終的には剥離脱落する。レクチンの各層に対する反応性の差異は、この上皮の分化の過程で、細胞膜の糖鎖に分化度に対応した変化が起こることを表わす。このような層構造に対応したレクチン染色性の変化は、皮膚 (Ookusa, *et al.*, 1983)、食道 (野上ら, 1985、山口ら, 1985)、口腔粘膜 (Mizukawa, *et al.*, 1994) などの重層扁平上皮で知られている。

癌組織で結合反応の亢進が観察された PNA、VVA および SBA は、ガラクトース乃至 N-アセチルガラクトサミンを認識する。特に PNA が認識する糖鎖は主に

Gal-β1,3-GalNAc であり (Liener, *et al.*, 1986) 、O-グリコシド型の糖蛋白質糖鎖に典型的に存在する。従ってPNA 反応亢進のメカニズムとしては、(1)ガラクトース結合の増加、(2)ガラクトース残基をマスクするN-アセチルガラクトサミンの減少に伴う非還元末端ガラクトースの増加、(3)ガラクトース残基をマスクするシアル酸の減少に伴う非還元末端ガラクトースの増加などの可能性が考えられ、いずれの場合もO-グリコシド型の糖蛋白質糖鎖に作用する糖転移酵素の活性の変化が示唆される。ただし、シアリダーゼ処理にて正常組織、腫瘍組織ともにレクチン反応の強度に変化が見られなかったため(3)の可能性は低い。また、N-アセチルガラクトサミンに親和性の強いDBAの反応に変化が見られなかったため(2)の可能性も低いと考えられる。従って、PNA反応の亢進はガラクトース結合の増加による可能性が最も高いと思われる。

正常組織ならびに腫瘍組織で観察されたゴルジ層板のレクチン反応を比較すると、正常組織ではPNA 反応がtrans 側のゴルジ層板に観察されたのに対し、腫瘍組織では反応がゴルジ層板の全層に亘って認められた。この事実からガラクトース転移酵素のサブオルガネラ・レベルでの分布の変化が示唆され、またかかる変化の結果として、ガラクトース残基の増加を招来した可能性が推察される。Aokiら(1995)は卵巣や子宮の上皮細胞内のガラクトース転移酵素が悪性化に伴って増強し、腫瘍マーカーとして有用であるとしている。さらに、Susumuら(1993)はヒト正常子宮内膜と腺癌とを比較して血液型糖鎖抗原である Le^b の分布が異なると報告し、この差異は癌細胞の糖鎖合成過程の異常に基づくものであり糖転移酵素の過剰発現によると結論づけている。本研究では、下咽頭においては癌化によってガラクトース転移酵素とりわけO-グリコシド型糖鎖の合成に関わるガラクトース転移酵素の発現が変化することが示唆され、興味深い。

D.3.他の頭頸部領域における扁平上皮癌組織との比較

現在までに報告されている頭頸部の他の領域(口腔・喉頭)の扁平上皮癌を対象とする組織化学的研究結果を検討すると、データが断片的で全体として所見が整合性を欠くものが多く、さらに光顕所見のみを挙げ、裏付けとなる電顕所見を記載していない報告がほとんどである。

本研究と同様に癌組織におけるPNA反応亢進を指摘している報告もあるが、一般

に正常重層扁平上皮に出現すると考えられるPNA反応が正常組織に認められなかった（喉頭: Feinmesser, *et al.*, 1989）、或いは、正常・異常を問わず全ての構造に広汎に見られるべきConA反応が、癌組織では見られなかった（中咽頭上皮内癌: Freije, *et al.*, 1989）など、現在までに一般的に蓄積されている所見との相違が非常に大きく、そのため結果全体に対しての信頼性が低い。

レクチンの結合部位に関して、PNA反応が細胞膜のみならず細胞質にも見られるとする記載がある（口腔: Vigneswaran, *et al.*, 1990）。これは光顕観察に基づく所見であり、著者らは、裏付けとなる電顕的所見には言及していない。本研究はPNA反応がオルガネラ・レベルで細胞膜とゴルジ膜に局限し、一方、細胞質では漸慢性な結合は存在しないことを明かにした。光顕下で時に観察される細胞辺縁部の細胞質の反応および細胞内の広汎な反応は、本来ゴルジ装置に出るべき反応や細胞膜の反応が拡散したものであると強く示唆される。

本研究では下咽頭癌でのPNA反応の亢進ならびに癌組織の分化度とPNA反応強度および頻度の相関が明かになったが、Saku and Okabe(1989)は、口腔の正常および異形成粘膜を検索し、正常粘膜では基底細胞に局限するPNA反応が、異型性の程度が高い程全層に広がるとしている。癌組織でのPNA反応の亢進に至る過程を反映すると考えられ興味深い。

D.4. 今後の課題

本研究により腫瘍組織においては複合糖質糖鎖のうち末端にガラクトースを持ったものが増加することが明かになった。この所見と、ゴルジ装置のレクチン染色パターンの変化とを考え併せると、細胞内での糖転移酵素の局在ならびに活性の変化が示唆される。今後の課題として、(1)糖転移酵素自体の追究、(2)糖鎖構造の質的変化の検索、が考えられる。また、下咽頭癌では低分化型が少ないため、本研究の症例中でも低分化型が少数であったことから、(3)低分化型症例の追加も今後に俟つところが大い。さらに、下咽頭癌組織と、他の頭頸部領域の癌組織との組織化学的性質の比較についても、今後別途検討を要する。

E. まとめ

正常重層扁平上皮では、各レクチンは上皮の層構造に対応してそれぞれ異なる染

色性を示した。これは、それぞれの層に存在する細胞の分化度に対応している。腫瘍組織では染色性の異なる細胞が集塊をなす傾向にあった。

レクチンにより、正常組織と腫瘍組織とで異なる染色性を示したが、とりわけ、PNA、VVA および SBA の結合パターンが際立った特徴を示した。中でも PNA では反応強度・頻度と腫瘍の分化度とが正の相関を示し、PNA 反応が腫瘍分化度の指標として有用であると考えられる。PNA 反応亢進のメカニズムとしてはガラクトース結合の増加の可能性が高く、O-グリコシド型の糖蛋白質糖鎖に作用する糖転移酵素の活性の変化が示唆される。レクチンの反応部位は、電顕的には主として細胞膜及びゴルジ膜に一致して認められた。正常組織ではPNA 反応がtrans 側のゴルジ層板に観察されたのに対し、腫瘍組織ではゴルジ層板全層に互って認められた。

これら事実から O-グリコシド型糖鎖の合成に関わるガラクトース転移酵素のサブオルガネラ・レベルでの分布の変化が示唆され、またかかる変化の結果として、ガラクトース残基の増加を招来した可能性が推察される。下咽頭扁平上皮癌でガラクトース転移酵素の発現が変化することが示唆され、興味深い。

謝辞

私にこの研究の機会を与えて下さった、東京大学耳鼻咽喉科学教室、加我君孝教授ならびに帝京大学、小林武夫教授に感謝いたします。また、組織化学に導いて下さり、本研究の当初からご指導を賜りました杏林大学医学部解剖学第2講座、平野寛教授を始め教室員の方々、並びに貴重な技術指導を賜りました同大学電子顕微教室の方々に深遠なる感謝の意を表します。

1. Ahrens, P. B., Ankel, H.: The Role of Asparagine-linked Carbohydrate in Natural Killer Cell-mediated Cytolysis. *J Biol Chem*, 262:7575-7579, 1987.
2. Amakawa, T., Barka, T.: Distribution of Concanavalin A Binding Sites on the Surface of Dissociated Rat Submandibular Acinar Cells. *J Histochem Cytochem*, 23: 607-617, 1975.
3. Aoki, D., Nozawa, S., Iizuka, R., Kawakami, H., Hirano, H.: Differences in Lectin Binding Patterns of Normal Endometrium and Endometrial Adenocarcinoma, with Special Reference to Staining with *Ulex europaeus* Agglutinin I and Peanut Agglutinin. *Gynecol Oncol*, 37: 338-345, 1990.
4. Aoki, D., Susumu, N., Kawakami, H., Hirano, H., Nozawa, S.: Phenotypic Alteration of Carbohydrate Antigens in Gynecological Malignancy. *Acta Histochem Cytochem*, 28: 197-201, 1995.
5. Ariano, M. C., Wiley, E. L., Ariano, L., Coon, IV, J. S., Tetzlaff, L.: Peanut Lectin Receptor, and Carcinoembryonic Antigen Distribution in Keratoacanthomas, Squamous Displasias, and Carcinomas of Skin. *J Dermatol Surg Oncol*, 11: 1076-1083, 1985.
6. Aubery, M., Guillouzo, A., Bernard, B.: Changes in Ricinus communis Lectin Binding to the Cell Surface of Human Liver Cells in Culture. *Exp Cell Res*, 129: 273-280, 1980.
7. Beppu, H., Nakajima, M., Nishiyama, F., Uono, M., Hirano, H.: Concanavalin A Binding Sites on the Erythrocytes of Normal and Genetically Dystrophic Chickens. *J Neurol Sci*, 59: 401-414, 1983.
8. Boland, C. R., Montgomery, C. K., Kim, Y. S.: A Cancer-associated Mucin Alteration in Benign Colonic Polyps. *Gastroenterology*, 82: 664-672, 1982.
9. Brabec, R. K., Peters, B. P., Bernstein, I. A., Gray, R. H., Goldstein, I. J.: Differential Lectin Binding to Cellular Membrane in the Epidermis of the Newborn Rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 477-479, 1980.
10. Bychkov, V., Toto, P. D.: Wheat Germ and Peanut Agglutinin Binding to Normal, Dysplastic and Neoplastic Cervical Epithelium. *Gynecol Obstet Invest*, 21: 158-163, 1986.
11. Chiba, I., Shindo, M., Yasuda, M., Yamazaki, Y., Amemiya, A., Sato, Y., Fujinaga, K., Notani, K., Fukuda, H.: Mutations in the p53 Gene and Human Papillomavirus

Infection As Significant Prognostic Factors in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Oncogene*, 12: 1663-1668, 1996.

12. Cooper, H. S.: Lectins as Probes in Histochemistry and Immunohistochemistry: the Peanut (*Arachis hypogaea*) Lectin. *Hum Pathol*, 15: 904-906, 1984.
13. 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.
14. Damjanov, I.: Biology of Disease. Lectin Cytochemistry and Histochemistry. *Lab Invest*, 57: 5-20, 1987.
15. Danguy, A., Kiss, R., Pasteels, J.-L.: Lectins in Histochemistry. *Biol Struct Morphogen*, 1: 93-106, 1988.
16. Dennis, J. W., Laferté, S.: Recognition of Asparagine-linked Oligosaccharides on Murine Tumor Cells by Natural Killer Cells. *Cancer Res*, 45: 6034-6040, 1985.
17. Dennis, J. W., Laferté, S., Waghon, R. B., Breitman, M., Kerbel, R.: b1-6 Branching of Asn-linked Oligosaccharides Is Directly Associated with Metastasis. *Science*, 236: 582-585, 1987.
18. Feinmesser, R., Freeman J.L., Noyek, A., van Nostrand, P.: Lectin Binding Characteristics of Laryngeal Cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 100: 207-209, 1989.
19. Feinmesser, R., Freeman J.L., Noyek, A., Brama, I., van Nostrand, P.: A Study of Cell Membrane Structure. *J Surg Oncol*, 43: 172-176, 1990.
20. Franklin, W. A.: Tissue Binding of Lectins in Disorders of the Breast. *Cancer*, 51: 295-300, 1983.
21. Freije, S. A., Mostofi, R. S., Bostwick, D. G.: Alterations in Glycoconjugate Expression Following Malignant Transformation of Human Oropharyngeal Squamous Mucosa. *Laryngoscope*, 99: 197-203, 1989.
22. Gahmberg, C. G., Hakomori, S.: Altered Growth Behavior of Malignant Cells Associated with Changes in Externally Labeled Glycoprotein and Glycolipid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70:3329-3333, 1973.
23. Gilbert, C. W., Zaroukian, M. H., Esselman, W. J.: Poly-N-acetylactosamine Structures on Murine Cell Surface T200 Glycoprotein Participate in Natural Killer Cell Binding

to YAC-1 Targets. *J Immunol*, 140: 2821-2828, 1988.

24. Heng, M. C. Y., Fallon-Friedlander, S., Bennett, R.: Expression of *Ulex europaeus* Agglutinin I Lectin-binding Sites in Squamous Cell Carcinomas and Their Absence in Basal Cell Carcinomas. *Am J Dermatopathol*, 14: 216-219, 1992.
25. Hiraizumi, S., Takasaki, S., Nishihira, T., Mori, S., Kobata, A.: Comparative Study of the N-Linked Oligosaccharides Released from Normal Human Esophageal Epithelium and Esophageal Squamous Carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 81: 363-371, 1990.
26. Hirano, H., Parkhouse, B., Nicolson, G. L., Lennox, E. S., Singer, S. J.: Distribution of saccharide of membrane fragments from a myeloma-cell homogenate: Its implications for membrane biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 69:2945-2949, 1972.
27. Hirano, H.: Ultracytochemical Studies on the Macromolecular Architecture and Transmembrane Control of the Cell Membrane. *Acta Histochem Cytochem*, 13: 127-138, 1980.
28. Hirano, H., Nishiyama, F., Yokoyama, M.: Regional Differences in Cytochemical Properties of the Plasma Membrane of Rat Bladder Transitional Epithelial Cells. In: Hashimoto, H. et al. eds.: Recent Development of Electron Microscopy 1985 - Proceedings of the Third Chinese-Japanese Electron Microscopy Seminar. Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo, 1986, pp. 275-284.
29. Holthöfer, H., Virtanen, I., Pettersson, E., Tönroth, T., Althman, O., Linder, E., Miettinen, A.: Lectins As Fluorescence Microscopic Markers for Saccharides in the Human Kidney. *Lab Invest*, 45: 391-399, 1981.
30. Hori, T., Nishiyama, F., Matsunami, M., et al.: Lectin-binding Sites of the Human Pituitary Adenoma Cells by Means of Ferritin-labeling Technique. *Acta Neurophthol (Berl)*, 56: 67-74, 1982.
31. Hori, T., Nishiyama, F., Anno, Y., Adachi, S., Numata, H., Hokama, Y., Muraoka, K., Hirano, H.: Difference of Lectin Binding Sites of Granules Between Normal Pituitary and Adenoma Cells. *Acta Neurophthol*, 66: 177-183, 1985.
32. Howard, D. R., Batsakis, J. G.: Cytostructural Localization of a Tumor-associated Antigen. *Science*, 210: 201-203, 1980.
33. Humphries, M. J., Matsumoto, K., White, S. L., Olden, K.: Oligosaccharide Modification by Swainsonine Treatment Inhibits Pulmonary Colonization by B16-F10 Murine

34. Hyun, K.-H., Nakai, M., Kawamura, K., Mori, M.: Histochemical Studies of Lectin Binding Patterns in Keratinized Lesions, Including Malignancy. *Virchow Arch [Pahtol Anat]*, 402: 337-351, 1984.
35. 神奈木玲児 編: 最新医学からのアプローチ(9) — 複合糖質 — 臨床医学との接点. メジカルビュー社, 東京, 1994.
36. Kannon, G., Park, H. K.: Utility of Peanut Agglutinin (PNA) in the Diagnosis of Squamous Cell Carcinoma and Keratoacanthoma. *Am J Dermatopathol*, 12: 31-36, 1990.
37. Kawai, N., Nishiyama, F., Hirano, H.: Changes of Lectin-binding Sites on the Embryonic Muscle Cell Surface in the Developing Ascidian, *Halocynthia aurantium*. *Exp Cell Res*, 122: 293-304, 1979.
38. Kawakami, H., Hirano, H.: Lectin-binding Patterns on the Plasma Membranes of Dissociated Rat Liver Cells. *Histochem*, 80: 415-420, 1984.
39. Kawakami, H., Ito, M., Miura, Y., Hirano, H.: Lectin-histochemical Studies on the Process of Liver Metastasis of Mouse Colon Carcinoma (Colon 26) Cells. *Acta Histochem Cytochem*, 24: 577-582, 1992.
40. Kawakami, H., Hirano, H.: Lectin Histochemistry and Cytochemistry. In: Ogawa, K. and Barka T. eds.: *Electron Microscopic Cytochemistry and Immunocytochemistry in Biomedicine*. CRC Press, Tokyo, 1993, pp.319-332.
41. Kawakami, H., Ito, M., Miura, Y., Hirano, H.: Expression of Lewisx Sugar Structure in Liver Metastasis of Mouse Colon Carcinoma (colon 26) Cells. *Clin Exp Metastasis*, 12: 129-133, 1994.
42. Kellokumpu, I., Karhi, K., Andersson, L. C.: Lectin-binding Site in Normal, Hyperplastic, Adenomatous and Carcinomatous Human Colorectal Mucosa. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A*, 94: 271-280, 1983.
43. Laferté S., Dennis, J. W.: Glycosylation-dependent Collagen-binding Activities of Two Membrane Glycoproteins in MDAY-D2 Tumor Cells. *Cancer Res*, 78: 4743-4748, 1988.
44. Liener, I. E., Sharon, N., Goldstein, I. J. eds.: *The Lectins - Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press, Florida, 1986.

45. Machinami, R., Oono, Y.: Carcinoembryonic Antigen and Lectin Binding in the Bile Canalicular Structures of Hepatocellular Carcinoma. *Virchows Arch A*, 412: 111-118, 1987.
46. Michael, L. N.: Epidermal Intercellular Staining with Fluorescein-conjugated phytohemagglutinins. *J Invest Dermatol*, 60: 61-66, 1973.
47. 宮原 裕: 下咽頭悪性腫瘍の早期診断. *JOHNS*, 2: 923-928, 1986.
48. Mizukawa, Y., Takata, K., Ookusa, Y., Nagashima, M., Hirano, H.: Lectin Binding Pattern in Normal Human Labial Mucosa. *Histochem J*, 26: 863-869, 1994.
49. Neathem, A., Dokal, I., Atkins, N.: Lectin Binding to Normal and Malignant Breast Tissue. *Diagnost Histopathol*, 6: 171-180, 1983.
50. Nemanic, M. K., Whitehead, J. S., Elias, P. M.: Alterations in Membrane Sugars During Epidermal Differentiation: Visualization with Lectins and Role of Glycosidases. *J Histochem Cytochem*, 31: 887-897, 1983.
51. 日本頭頸部腫瘍学会 (編): 臨床・病理 頭頸部癌取扱い規約. 金原出版, 東京, 1982.
52. 野上博司, 伊藤正高, 平野 寛: 食道癌. *中外医薬*, 38: 706-709, 1985.
53. Nogami, H., Nabeya, K., Ito, M., Yamaguchi, Y., Hirano, H.: Changes in Lectin Binding Pattern of Human Esophagus in Association with Malignancy. In: Siewert, J. R. and Hölscher, A. H. eds.: *Diseases of the Esophagus*. pp.55-59, Springer-Verlag, Heidelberg, 1988.
54. Ookusa, Y., Takata, K., Nagashima, M., Hirano, H.: Distribution of Glycoconjugates in Normal Human Skin Using Biotinyl Lectins and Avidin-Horseradish Peroxidase. *Histochem*, 79: 1-7, 1983.
55. Ookusa, Y., Takata, K., Nagashima, M., Hirano, H.: Lectin-Binding Pattern in Extramammary Paget's Disease by Horseradish Peroxidase (HRP)-Labeling Method - Specific Staining with Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA). *Arch Dermatol Res*, 277: 65-70, 1985.
56. Pena, S. D. J., Gordon, B. B., Karpatis, G., Carpenter, S.: Lectin Histochemistry of Human Skeletal Muscle. *J Histochem Cytochem*, 29: 542-546, 1981.
57. Pierce, M., Arango, J.: Rous Sarcoma Virus-transformed Baby Hamster Kidney Cells Express Higher Levels of Asparagine-linked Tri- and Tetraantennary Glycopeptides

- Containing [GlcNAc- β (1,6)Man- α (1,6)Man] and Poly-*N*-acetylactosamine Sequence than Baby Hamster Kidney Cells. *J Biol Chem*, 261: 10772-10777, 1986.
58. Rademacher, T. W., Parekh, R. B., Dwek, R. A.: Glycobiology. *Ann Rev Biochem*, 57: 785-838, 1988.
59. Rauvala, H., Carter, W. G., Hakomori, S.: Studies on Cell Adhesion and Recognition 1. Extent and Specificity of cell Adhesion Triggered by Carbohydrate-reactive Proteins (Glycosidases and Lectins) and by Fibronectin. *J Cell Biol*, 88: 127-137, 1981.
60. Reano, A., Faure, M., Jacques, Y., Reichert, U., Schaefer, H., Thivolet, J.: Lectins as Markers of Human Epidermal Cell Differentiation. *Differentiation*, 22: 205-210, 1982.
61. Roberson, M. M., Armstrong, P. B.: Regional Segregation of ConA Receptors on Dissociated Amphibian Embryo Cells. *Exp Cell Res*, 122: 23-29, 1979.
62. Rosati, F., Santis, R. D.: Role of the Surface Carbohydrates in Sperm-egg Interaction in *Ciona intestinalis*. *Nature*, 283: 762-764, 1980.
63. Roseman, S.: The Synthesis of Complex Carbohydrates by Multiglycosyltransferase System and Their Potential Function in Intercellular Adhesion. *Chem Phys Lipids*, 5: 270-297, 1980.
64. Roth, J.: The Lectins: Molecular Probes in Cell Biology and Membrane Research. *Exp Pathol (Suppl)*, 3: 1-180, 1978.
65. Saku, T., Okabe, H.: Differential Lectin-bindings in Normal and Precancerous Epithelium and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Mucosa. *J Oral Pathol Med*, 18: 438-445, 1989.
66. Sato, E., Murata, K., Yonezawa, S., Nakamura, T.: Blood Group (O) Antigen in Normal, Dysplastic and Carcinomatous Esophageal Epithelium. *Gann*, 75: 223-229, 1984.
67. Schaumberg-Lever, G., Alroy, J., Ucci, A., Lever, W. F.: Cell Surface Carbohydrates in Proliferative Epidermal Lesions. *J Cutan Pathol*, 13: 163-171, 1986.
68. Sharon, N., Lis, H.: Lectins: Cell-agglutinating and Sugar-specific Proteins. Lectins Provide New Tools for Studying Polysaccharides, Glycoproteins, and Cell Surface, and for Cancer Research. *Science*, 177: 949-959, 1972.
69. Shanmugaratnam, K. In Collaboration with L. H. Sobin and Pathologists in 8 Countries: Histological Typing of Tumours of the Upper Respiratory Tract and Ear (2nd ed.).

Springer-Verlag, Berlin, 1991.

70. Sobrinho-Simões, M., Damjanov, I.: Lectin Histochemistry of Papillary and Follicular Carcinoma of the Thyroid Gland. *Arch Pathol Lab Med*, 110: 722-728, 1986.
71. Susumu, N., Kawakami, H., Aoki, D., Hirano, H., Nozawa, S.: Subcellular Localization of Blood Group Le^b Carbohydrate Antigen (MSN-1-reactive Antigen) in Endometrial Cancer Cells. *Cancer Res*, 53: 3643-3648, 1993.
72. Takata, K., Hirano, H.: Changes in Soybean Agglutinine (SBA) and Peanut Agglutinin (PNA) Binding Pattern in the Epidermis of the Developing Chick Embryo. *Develop Growth Differ*, 25: 299-305, 1983.
73. Takata, K., Arai, T., Yamagishi, S., Hirano, H.: Concanavalin A (ConA) Receptors in Mouse Macrophages Demonstrated in Thick Sections with a 1,000 kV Transmission Electron Microscope. *Proc Jpn Acad*, 60(B): 273-276, 1984.
74. Toto, P.D., Gargiulo, A.W.: Lectin Binding to Oral Squamous Carcinoma. *Cancer Detect Prev*, 8: 161-168, 1985.
75. Union Internationale Contre le Cancer (International Union Against Cancer): TNM Classification of Malignant Tumours (4th ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1987.
76. Vigneswaran, N., Peters, K.-P., Hornstein, O. P., Diepgen, T. L.: Alteration of Cell Surface Carbohydrates Associated with Ordered and Disordered Proliferation of Oral Epithelia: a Lectin Histochemical Study in Oral Leukoplakias, Papillomas and Carcinomas. *Cell Tissue Kinet*, 23: 41-55, 1990.
77. Vijayan, K.K., Remani, P., Haseena Beevi, V.M., Ankathil, R., Vijayakumar, T., Rajendran, R., Augustine, J., Vasudevan, D. M.: Tissue Binding Patterns of Lectins in Premalignant and Malignant Lesions of the Oral Cavity. *J Exp Pathol*, 3: 295-304, 1987.
78. Warren, L., Buck, C. A., Tuszyński, G. P.: Glycopeptide Changes and Malignant Transformation, a Possible Role for Carbohydrate in Malignant Behavior. *Biochim Biophys Acta*, 516: 97-127, 1978.
79. 山口嘉和, 伊藤正高, 斉藤昌三, 青柳利雄, 高田邦昭, 平野 寛: ヒト健常食道粘膜におけるレクチン結合パターンの組織細胞化学的検討. *解剖誌*, 60: 104-108, 1985.
80. Yamamoto, K., Tsuji, T., Tarutani, O., Osawa, T.: Structural Changes of Carbohydrate Chains of Human Thyroglobuline Accompanying Malignant Transformations of

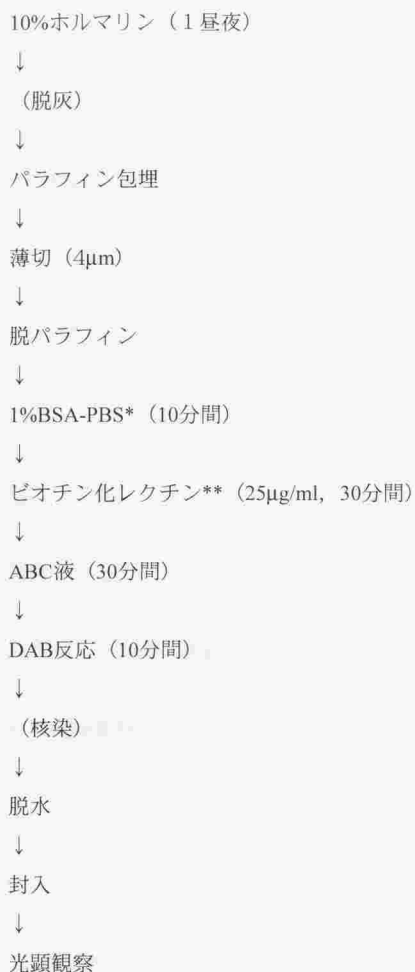
Thyroid Glands. Eur J Biochem, 143: 133-144, 1984.

81. Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S., Kobata, A.: Comparative Study of the Oligosaccharides Released from Baby Hamster Kidney Cells and Their Polyoma Transformant by Hydrolysis. J Biol Chem, 259: 10834-10840, 1984.
82. Yamashita, K., Totani, K., Iwaki, Y., Takamisawa, I., Tateishi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., Kobata, A.: Comparative Study of the Sugar Chains of γ -glutamyltranspeptidases Purified from Human Hepatocellular Carcinoma and from Human Liver. J Biochem, 105: 728-735, 1989.
83. Yokoyama, M., Nishiyama, F., Irimura, T., Hirano, H.: Sugar Residues on the Cell Surface of the Dissociated Mouse Kidney Tubule Cells by Means of Ferritin-labeled Lectins. Acta Histochem Cytochem, 10: 42-50, 1977.
84. Yokoyama, M., Nishiyama, F., Kawai, N., Hirano, H.: The Staining of Golgi Membranes with *Ricinus communis* Agglutinin-horseradish Peroxidase Conjugate in Mice Tissue Cells. Exp Cell Res, 125:47-53, 1980.
85. Yokoyama, M., Nishiyama, F., Hirano, H.: Surface Morphology and Lectin-Binding Site of Normal and Neoplastic Urothelium in Rat and Human Urinary Bladder. In: Proceedings of the Kagoshima International Symposium of Glycoconjugates in Medicine, Professional Postgraduate Service, 1988.
86. Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S., Maruta, K., Nishi, M., Sato, E.: Binding of *Ulex europaeus* Agglutinin-I in Polyposis Coli: Comparative Study with Solitary Adenoma in the Sigmoid Colon and Rectum. J Natl Cancer Inst, 71: 19-24, 1983.
87. Zhang, S. M., Wu, M., Chen, H., Zhang, X.: Changes of Glycoconjugates in Human Hepatocellular Carcinoma. Histochem, 92: 171-175, 1989.
88. Zhu, B. C. R., Laine, R. A.: Polilactosamine Glycosylation on Human Fetal Placental Fibronectin Weakens the Binding Affinity of Fibronectin to Gelatin. J Biol Chem, 260: 4041-4045, 1985.
89. Zieske, J. D., Bernstein, I. A.: Modification of Cell Surface Glycoprotein: Addition of Fucosyl Residues During Epidermal Differentiation. J Cell Biol, 95: 626-631, 1982.

表1 本研究に使用したレクチンおよびその略称と阻害糖

レクチン		阻害糖
concanavalin A	(ConA)	α -methyl-D-mannoside
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin	(DBA)	N-acetyl-D-galactosamine
<i>Griffonia simplicifolia</i> agglutinin-1	(GS-1)	N-acetyl-D-galactosamine
peanut agglutinin	(PNA)	lactose
soybean agglutinin	(SBA)	N-acetyl-D-galactosamine
<i>Sophora japonica</i> agglutinin	(SJA)	N-acetyl-D-galactosamine
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-1	(UEA-1)	L-fucose
<i>Vicia villosa</i> agglutinin	(VVA)	N-acetyl-D-galactosamine
wheat germ agglutinin	(WGA)	N-acetyl-D-glucosamine

表2 レクチン光顕標本作製過程



対照実験では、*の段階で 0.1M の阻害糖を加え、切片をあらかじめ阻害糖と反応させた上、**のビオチン化レクチンに替えてビオチン化レクチン (25 μ g/ml) と阻害糖 (0.2M/ml) の混合物を用いた。

表3 レクチン電顕標本作製過程

2.5%グルタルアルデヒド - 0.1M リン酸緩衝液, pH7.4 (4℃、4時間)

↓

凍結切片 (50μm)

↓

HRP標識レクチン (100μg/ml) (4℃、72時間)

↓

DAB反応 (15分)

↓

1%四酸化オスミウム (1時間)

↓

脱水

↓

包埋 (エボン812)

↓

超薄切片作製

↓

電子染色 (クエン酸鉛)

↓

透過電顕観察

表4 本研究で対象とした下咽頭癌症例の内訳

4-1. T分類

T分類	T1	T2	T3	T4	不明
例数	6	13	14	1	2

UICC分類規準に基づくTNM分類のうちT分類では、T3、T4の進行癌症例が15例と、全体の半数近く（42%）を占めた。

4-2. N分類

N分類	N0	N1	N2	N3	不明
例数	17	4	10	3	2

UICC分類規準に基づくTNM分類のうちN分類では、N0（転移リンパ節なし）の症例が17例と、ほぼ半数（47%）を占めた。

4-3. M分類

M分類	M0	M1	不明
例数	33	1	2

UICC分類規準に基づくTNM分類のうちM分類では、M0（遠隔転移なし）の症例が大半（92%）を占めた。

4-4. 血液型

血液型	A	B	O	AB	不明
例数	10	9	9	2	6

ABO式血液型では、A、B、Oの各血液型がほぼ同数であった。

4-5. 分化度

分化度	高分化型	中分化型	低分化型
例数	24	12	0

H&E染色切片により分化度を検討した。全症例の1/3を高分化型が占め、低分化型は認められなかった。

表5 レクチン染色性の強度/頻度の分布

5-1. PNA染色性の強度/頻度の分布

	100-50%	50-10%	10%以下	0%
強	11	4	1	0
中等度	7	1	1	0
弱	1	2	1	0
無（陰性）	0	0	0	7

全例を合わせて検討するとPNA反応は強～中等度の反応が高頻度に認められる症例が多い。

5-1a. 高分化型扁平上皮癌におけるPNA染色性の強度/頻度の分布

	100-50%	50-10%	10%以下	0%
強	11	3	1	0
中等度	4	0	1	0
弱	0	2	1	0
無（陰性）	0	0	0	1

高分化型扁平上皮癌では、PNA反応は強度の反応が高頻度に認められる症例が多い。

5-1b. 中分化型扁平上皮癌におけるPNA染色性の強度/頻度の分布

	100-50%	50-10%	10%以下	0%
強	0	1	0	0
中等度	3	1	0	0
弱	1	0	0	0
無（陰性）	0	0	0	6

中分化型扁平上皮癌では、強度のPNA反応を示す症例は認められない。

5-2. SBA染色性の強度/頻度の分布

	100-50%	50-10%	10%以下	0%
強	20	2	1	0
中等度	6	3	0	0
弱	3	1	0	0
無（陰性）	0	0	0	0

SBA反応は強い反応が高頻度に認められる症例が多い。反応の頻度が低い症例は少数である。

5-3. VVA染色性の強度/頻度の分布

	100-50%	50-10%	10%以下	0%
強	19	1	0	0
中等度	10	2	0	0
弱	4	0	0	0
無（陰性）	0	0	0	0

VVA反応は強～中等度の反応が高頻度に認められる症例が多い。反応の頻度が低い症例はごく少数である。

5-4. SJA染色性の強度/頻度の分布

	100-50%	50-10%	10%以下	0%
強	0	3	1	0
中等度	3	0	0	0
弱	25	2	0	0
無（陰性）	0	0	0	2

SJA反応は弱い反応が高頻度に認められる症例が多い。強い反応を示す例はごく少数である。

5-5. GS-1染色性の強度/頻度の分布

	100-50%	50-10%	10%以下	0%
強	1	0	0	0
中等度	3	7	5	0
弱	11	1	2	0
無（陰性）	0	0	0	4

GS-1反応は中等度～弱い反応が認められる症例が多い。反応の頻度が高い症例がやや多い。

表6 下咽頭扁平上皮癌のレクチン染色性と各種の因子との分散分析の結果 (p 値)

	PNA頻度	PNA強度	SBA頻度	SBA強度	VVA頻度	VVA強度
分化度	0.0110*	0.0003**	0.3690	0.1085	0.9721	0.0324
性別	0.1848	0.0979	0.6124	0.8137	0.5596	-
血液型	0.8767	0.7071	0.7977	0.6721	0.7705	0.2992
T分類	0.3424	0.6453	0.9293	0.1471	0.9041	0.1096
N分類	0.7355	0.8576	0.4817	0.0660	0.4639	0.6138
M分類	0.4083	0.4543	0.6374	0.0289	0.7610	0.0390

*は危険率5%で有意、**は危険率1%で有意

レクチン反応の頻度および強度は、表5に示した各段階を3（頻度：100 - 50%、強度：強）から0（頻度：0%、強度：反応陰性）に点数化し、各群間で分散分析法を用いて評価した。ABO式血液型、TNM分類とPNA、SBA、VVA各レクチン反応の頻度および強度とには相関が認められなかった。扁平上皮癌の分化度と各レクチン結合性との分散分析では、PNA反応が結合強度、結合頻度のいずれの観点からも扁平上皮癌の分化度と相関（強度： $p < 0.01$ 、頻度： $p < 0.05$ ）することが確認された。

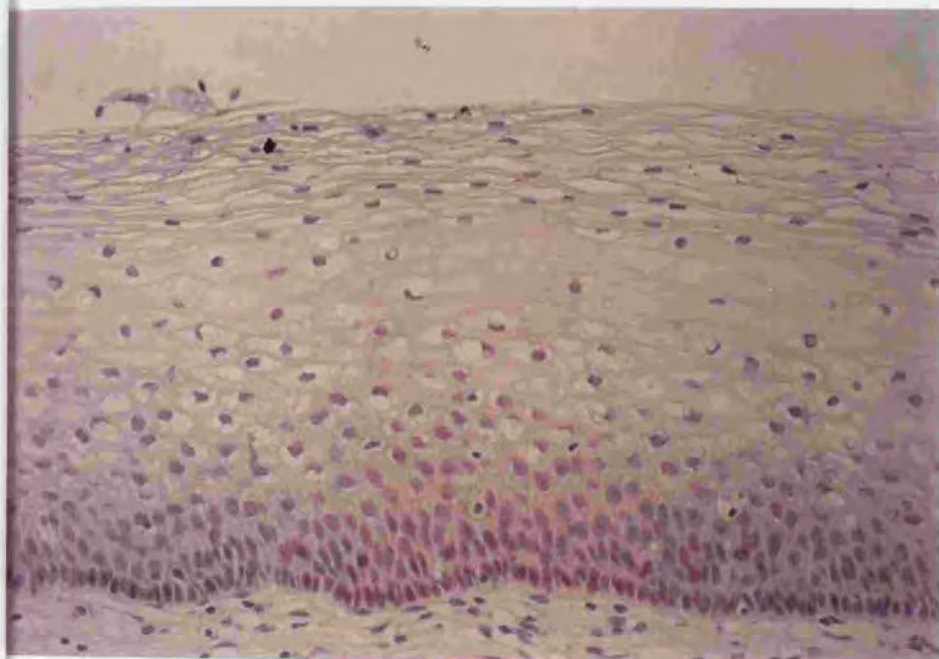


图1 正常下咽头上皮. H&E. $\times 400$.

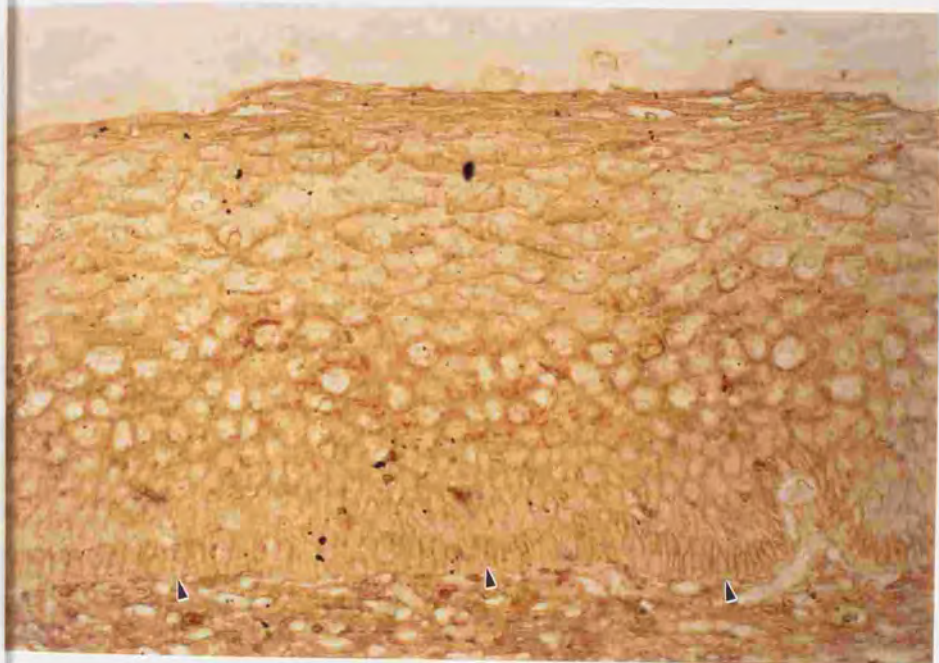


図2 正常下咽頭上皮. ConA染色. 上皮及び上皮下組織が一樣に染色されている.
矢尻: 上皮基底面. $\times 400$.



図3 正常下咽頭上皮，WGA染色．上皮及び上皮下組織に一樣に非常に強い陽性反応が見られる．矢尻：上皮基底面．×400．

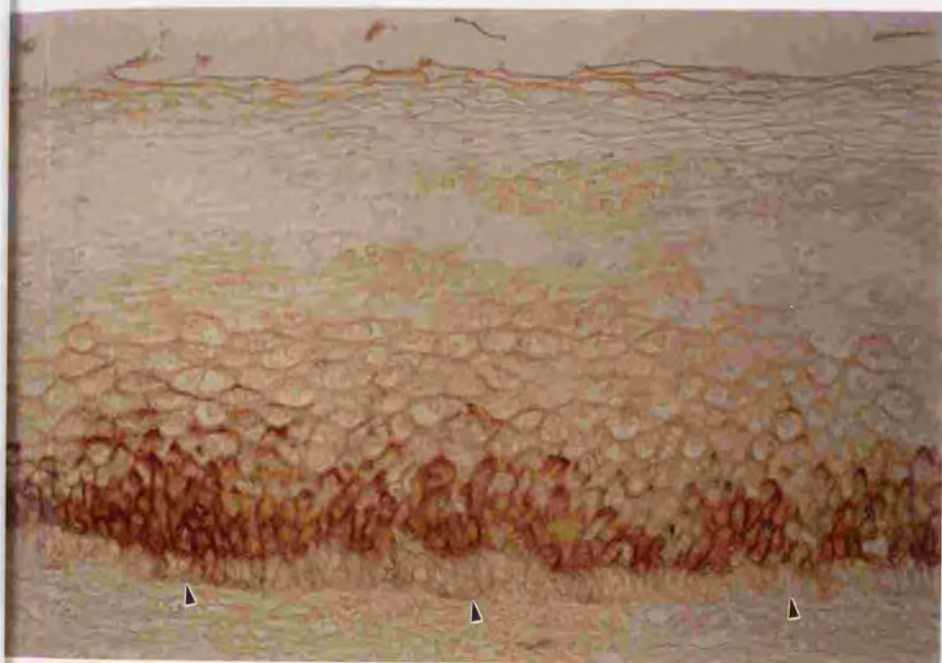


図4 正常下咽頭上皮. PNA染色. 有棘層の下層に陽性反応が見られる. 基底層では反応が弱い. 矢尻: 上皮基底面. $\times 400$.

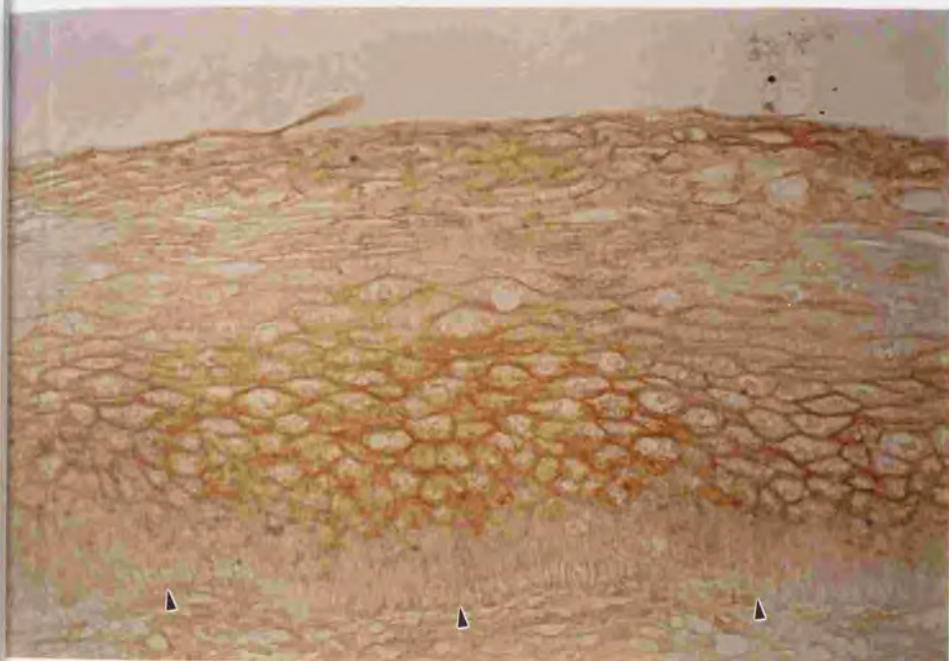


図5 正常下咽頭上皮，SBA染色．有棘層に中等度の陽性反応が見られる．矢尻：
上皮基底面， $\times 400$ ．



図6 正常下咽頭上皮、VVA染色。SBA染色像（図5）と同様、有棘層に中等度の陽性反応が見られる。矢尻：上皮基底面、 $\times 400$ 。

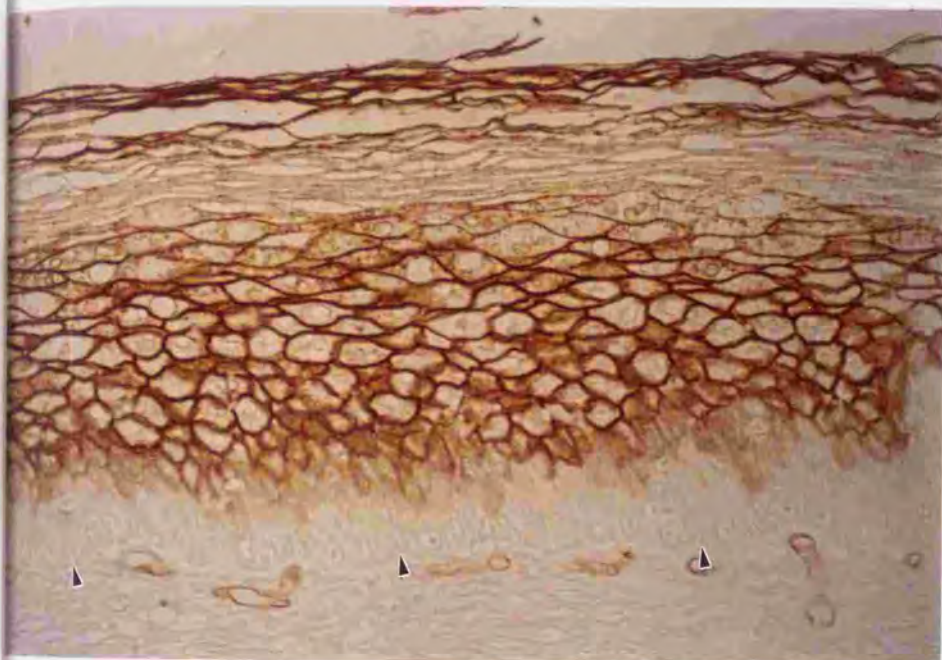


図7 正常下咽頭上皮，GS-1染色，有棘層に強い陽性反応が見られる，ただし，基底層に接する部位および基底層には反応が見られない，矢尻：上皮基底面， $\times 400$ 。

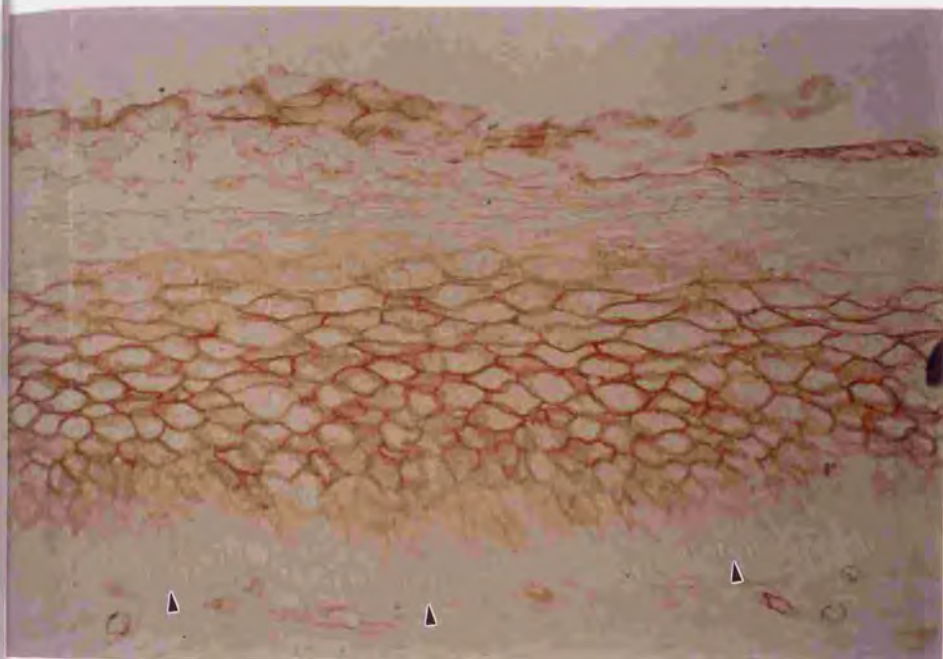


図8 正常下咽頭上皮，SJA染色，GS-I染色像（図7）と同様、有棘層中央部に陽性反応（中等度）が見られるが、有棘層深部および基底層には反応が見られない。矢尻：上皮基底面。×400。

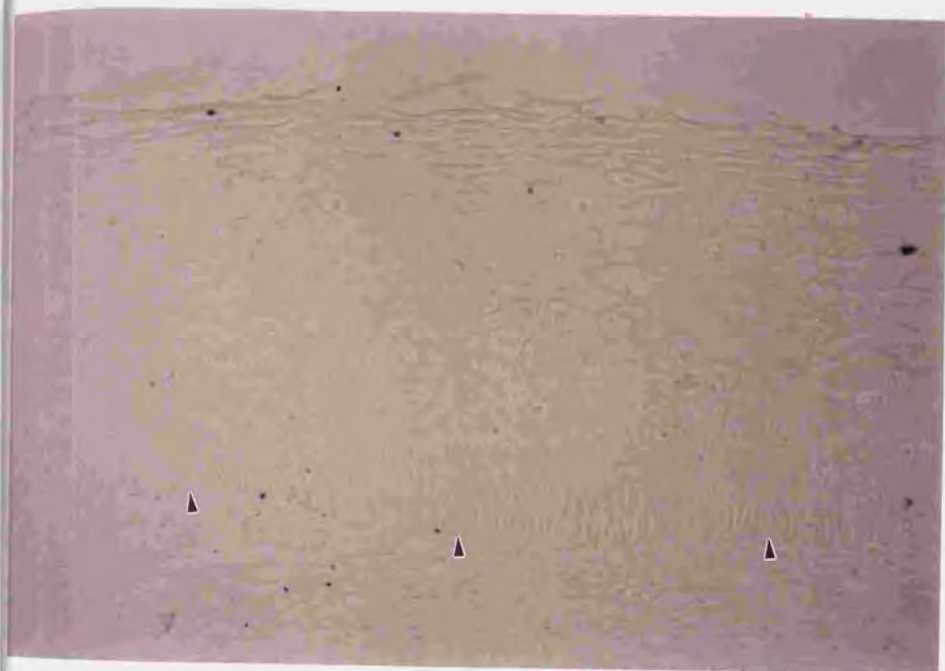


図9 正常下咽頭上皮，対照標本，SJAに対するハプテン糖（GalNAc）添加，陽性反応は認められない，矢尻：上皮基底面，×400.



図10 下咽頭重層扁平上皮に見られるレクチン結合パターン。模式図。各縦線は上皮の表層から基底層までの位置を表し、左端の模式図に対応する。レクチン結合反応が強いほどグラフが右に伸びる。

このように図示することにより、各レクチンの反応パターンの特徴が明確になる。WGAは全層が陽性反応を呈する。PNAは有棘層深層、浅層で染色性を異にし、分化度による反応性の相違が示唆される。SBA、VVA、GS-1、SJA-では相互に類似した反応パターンを示す。

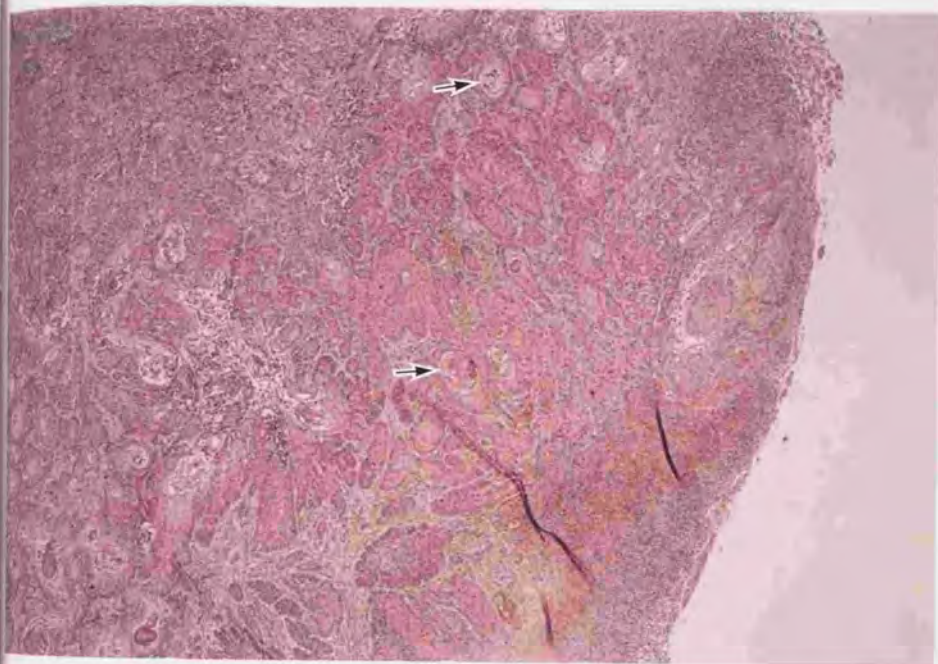


図11 高分化型下咽頭扁平上皮癌. H.&E. 分化度の高い腫瘍細胞が巣状に浸潤している. Keratin pearlの形成が見られる(矢印). $\times 50$.

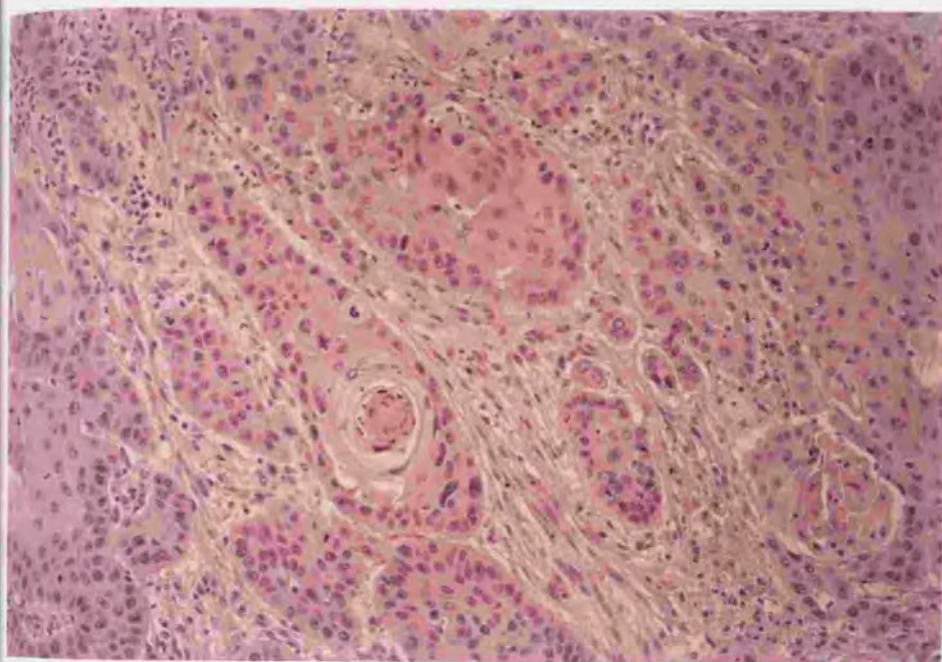


図12 高分化型下咽頭扁平上皮癌。H&E。図11の一部を拡大したもの。×240。

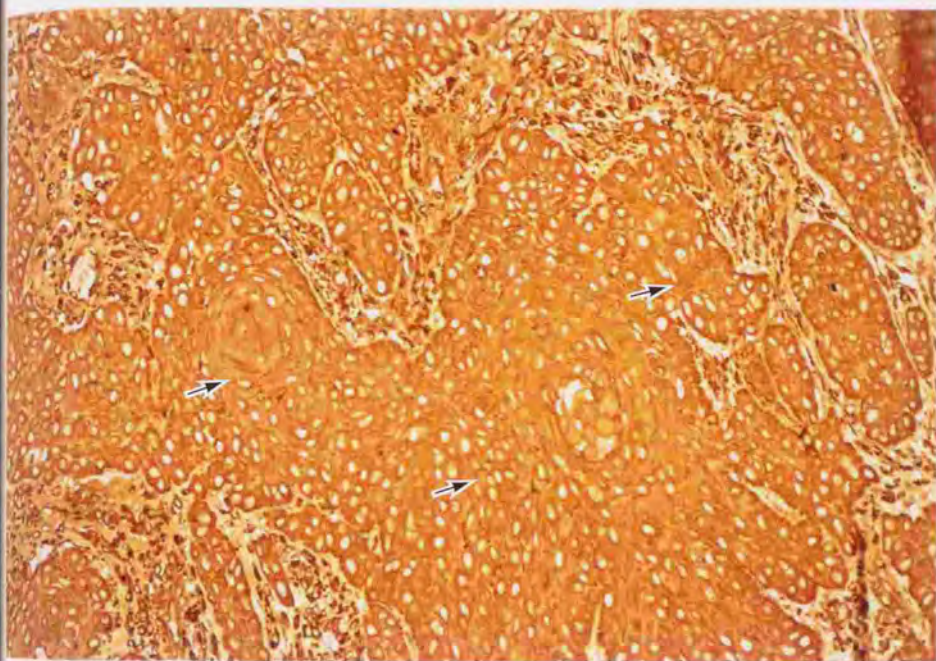


図13 高分化型下咽頭扁平上皮癌，ConA染色，癌細胞（矢印）をはじめ、いずれにも一様に陽性反応が見られる，反応は細胞膜・細胞質の両者に見られる，×240.

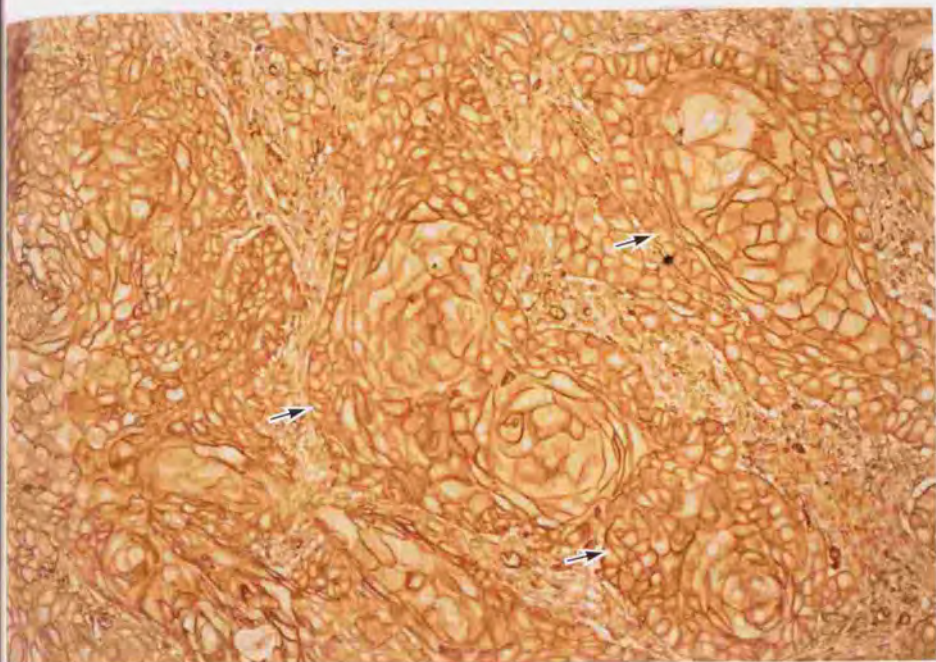


図14 高分化型下咽頭扁平上皮癌. WGA染色. 癌細胞(矢印)をはじめ一様に陽性反応が見られる. 反応は細胞膜に顕著である. $\times 240$.

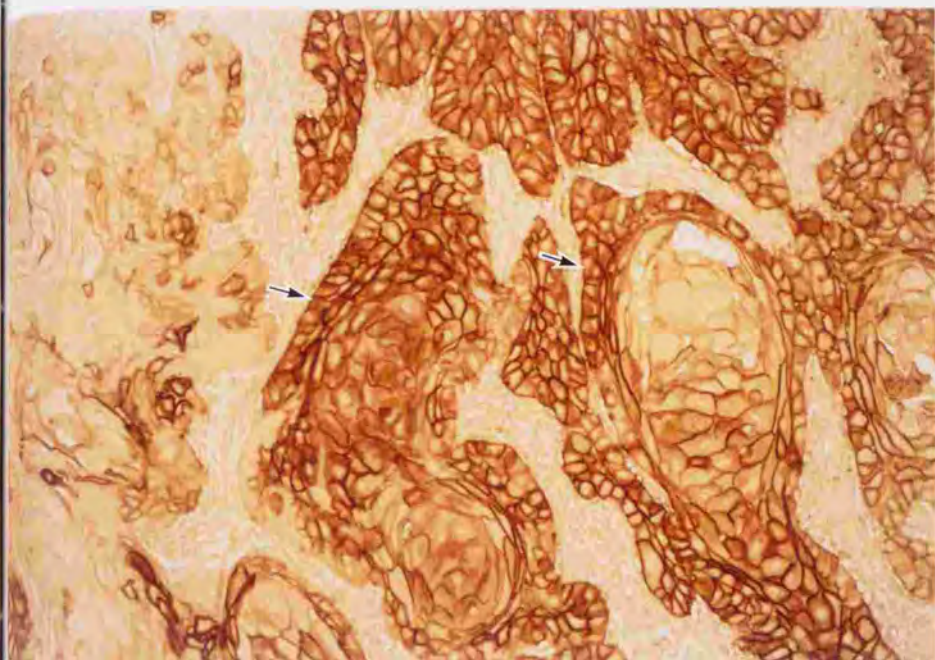


図15 高分化型下咽頭扁平上皮癌. PNA染色. 癌細胞（矢印）に一樣に強い陽性反応が見られる. 反応は細胞膜に顕著である. 間質の細胞には陽性反応はほとんど見られない. $\times 240$.

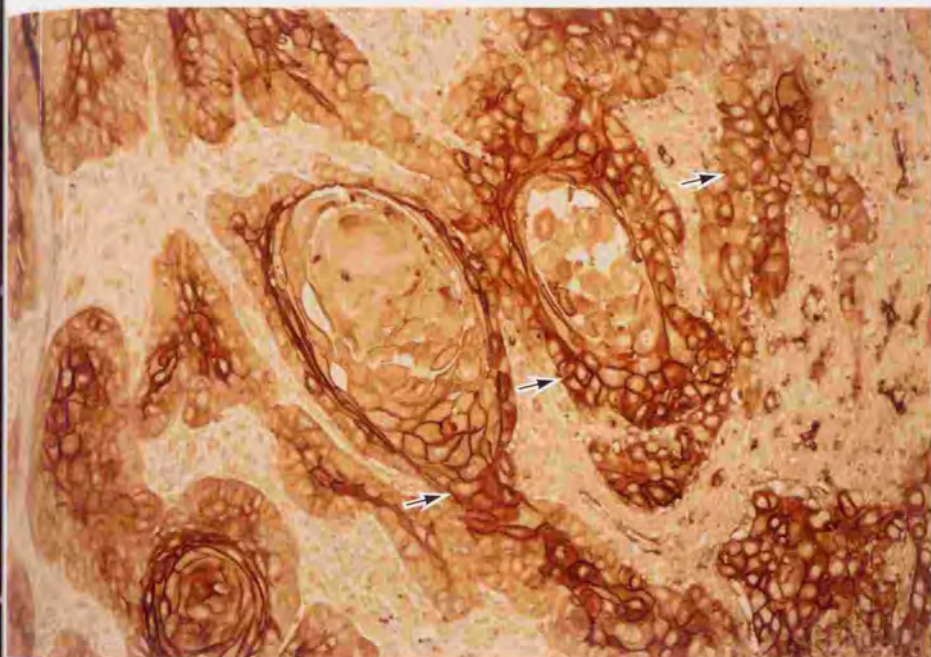


図16 高分化型下咽頭扁平上皮癌，SBA染色，癌細胞（矢印）に強い陽性反応が見られる。反応は細胞膜に顕著である，間質の細胞には陽性反応がほとんど見られない。×240.

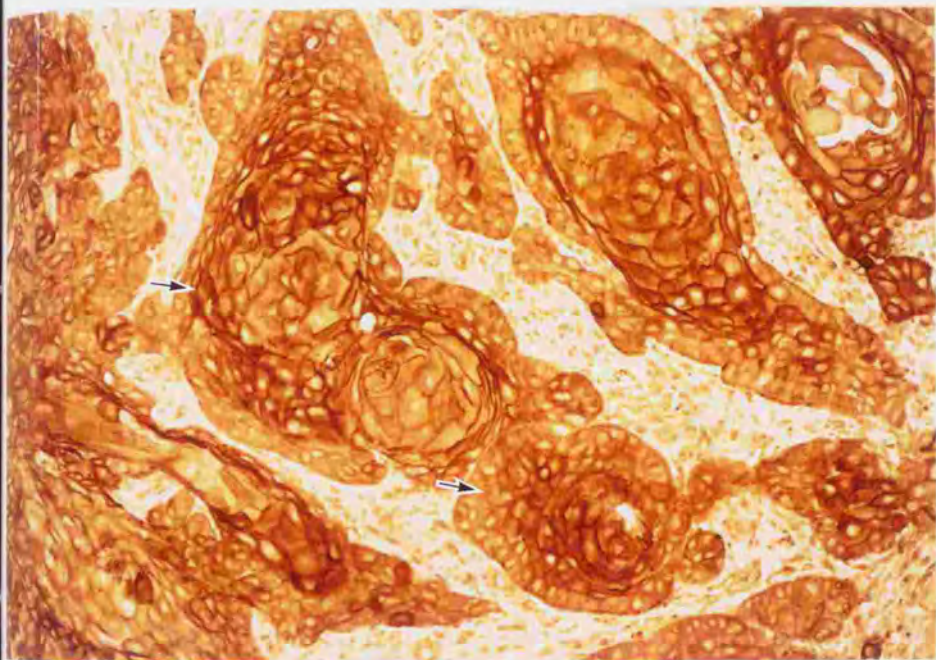


図17 高分化型下咽頭扁平上皮癌，VVA染色，癌細胞（矢印）に強い陽性反応が見られる。反応は細胞膜に顕著である，間質の細胞では陽性反応は弱い，
×240.

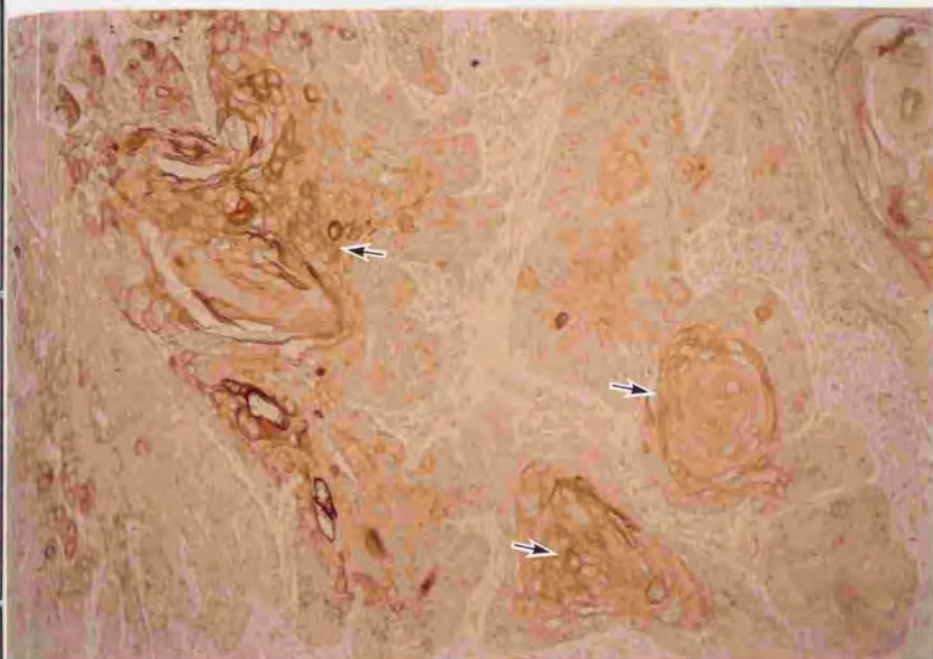


図18 高分化型下咽頭扁平上皮癌。GS-1染色。一部の癌細胞（矢印）では細胞膜に中等度の陽性反応が見られる。間質の細胞には陽性反応はほとんど見られない。×240。

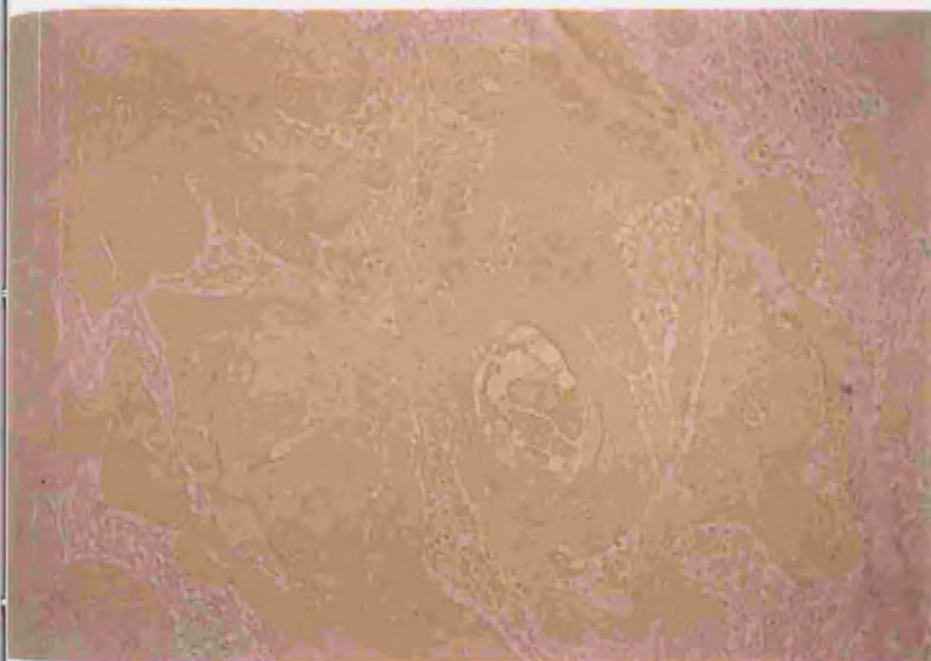


図19 高分化型下咽頭扁平上皮癌。SJA染色。陽性反応は認められない。×240。

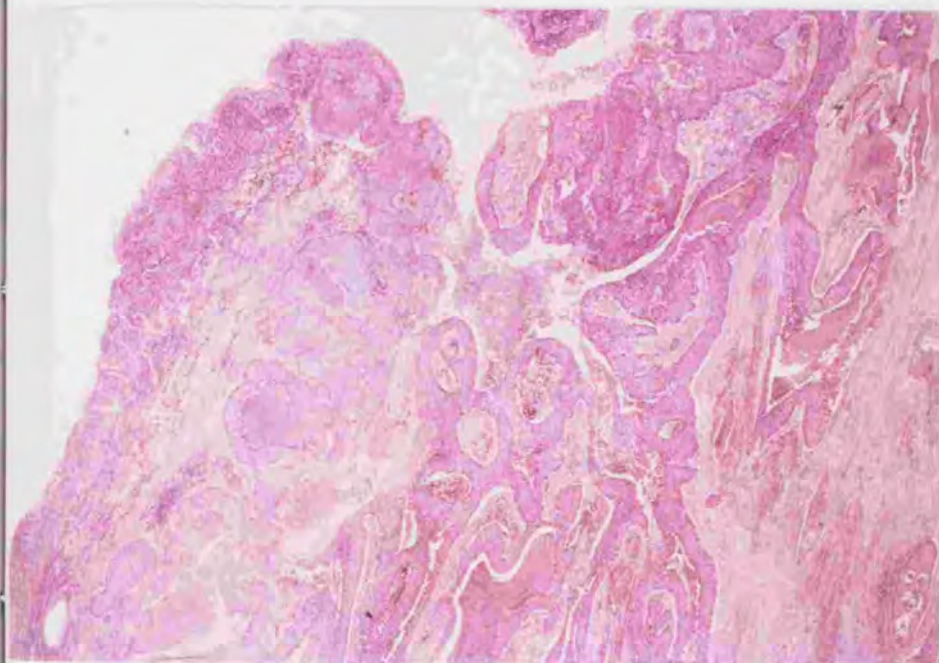


図20 中分化型下咽頭扁平上皮癌. H.&E. 腫瘍細胞が索状に浸潤している. $\times 35$.

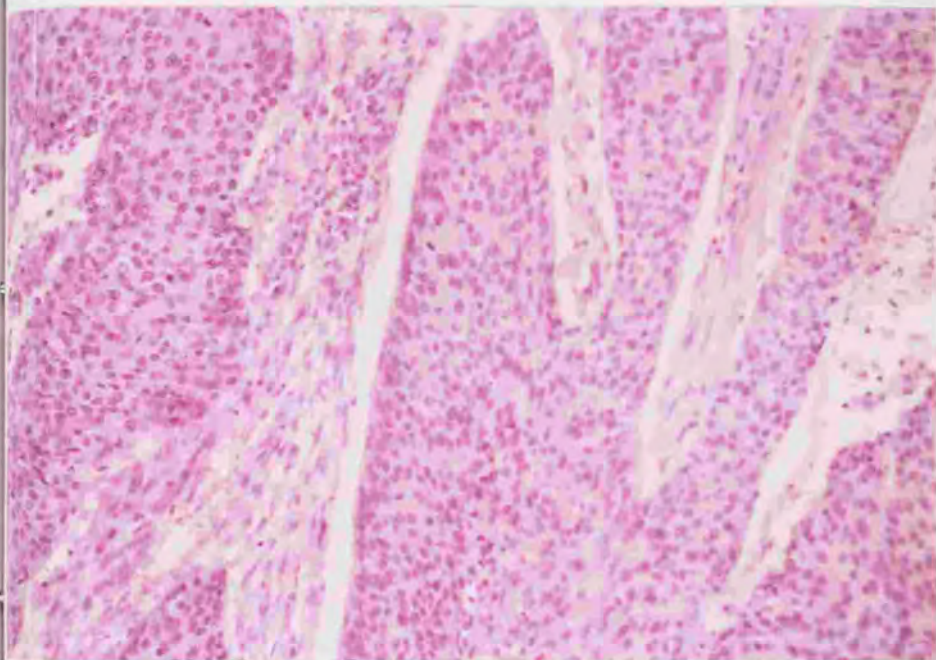


図21 中分化型下咽頭扁平上皮癌，H&E. 図20の一部を拡大したもの，×240.

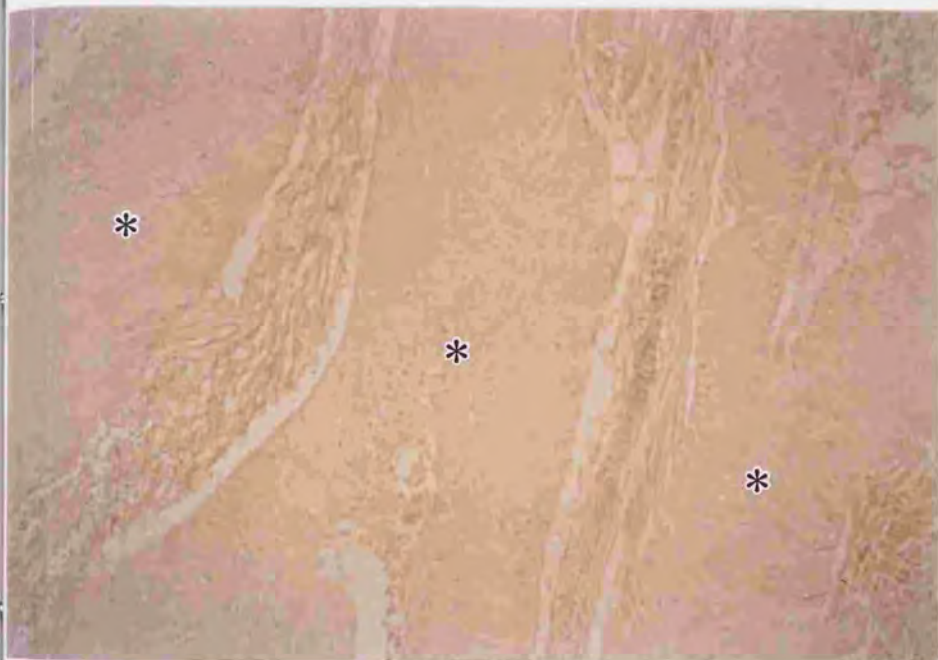


図22 中分化型下咽頭扁平上皮癌，PNA染色．癌細胞（星印）に陽性反応はほとんど見られない，×240．



図23 正常下咽頭上皮. WGA染色. 電顕写真. 表層の細胞では細胞膜に強い反応が見られる. $\times 6,300$.

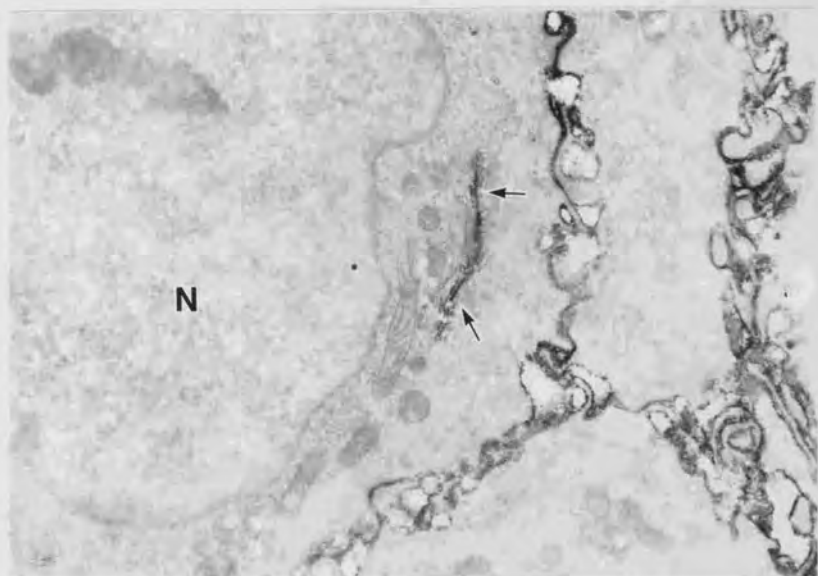


図24 正常下咽頭上皮有棘層細胞. WGA染色. 電顕写真. 細胞膜およびゴルジ膜 (矢印) に反応陽性である. N: 核. $\times 14,000$.

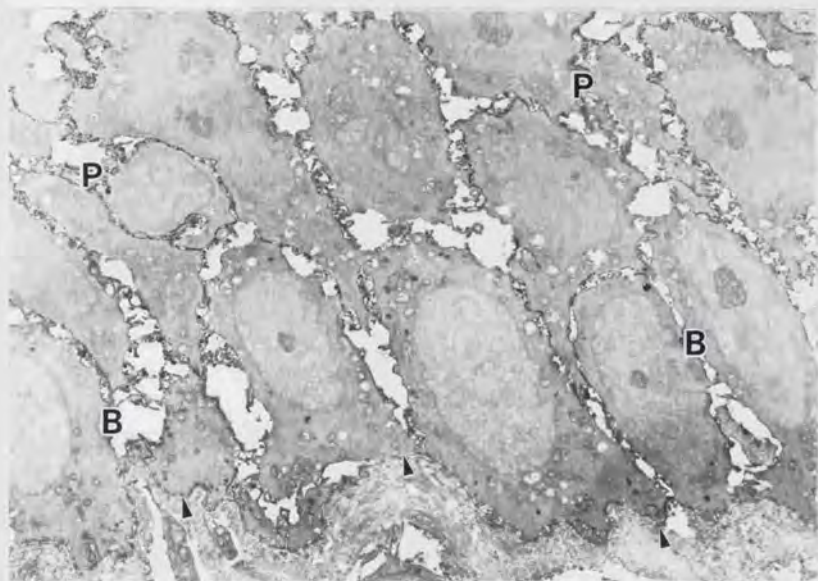


図25 正常下咽頭上皮. PNA染色. 電顕写真. 有棘層 (P)、とりわけ深層の細胞の細胞膜に反応陽性が見られる. 基底層 (B) 細胞の細胞膜にも陽性反応が認められる. 矢尻: 上皮基底面. $\times 4,300$.

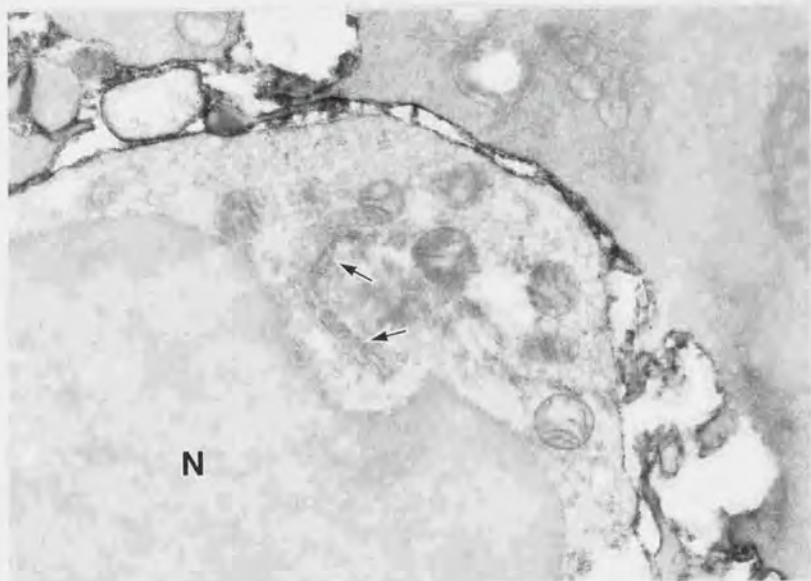


図26 正常下咽頭上皮，PNA染色，電顕写真．細胞膜は強陽性である．ゴルジ膜（トランス側）（矢印）に微弱な反応が見られる．N：核， $\times 20,000$ ．

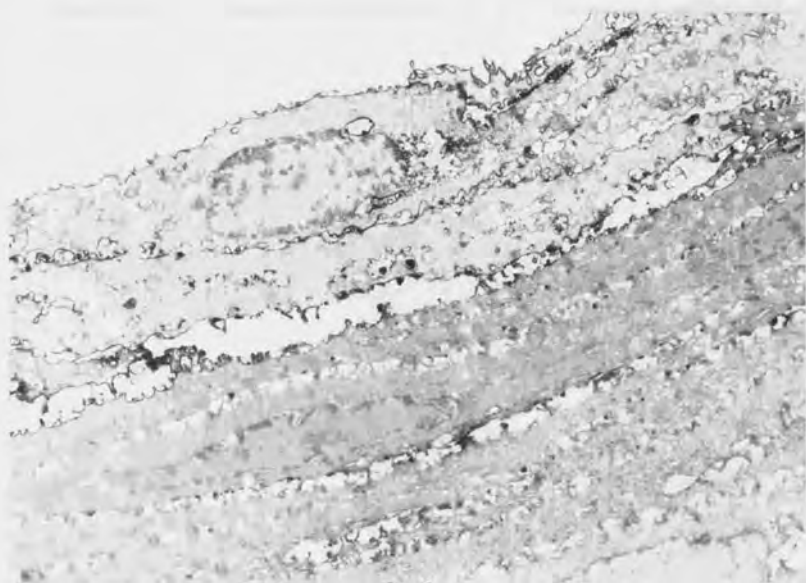


図27 正常下咽頭上皮，SBA染色，電顕写真．浅層の細胞の細胞膜が陽性反応を呈する． $\times 5,400$ ．

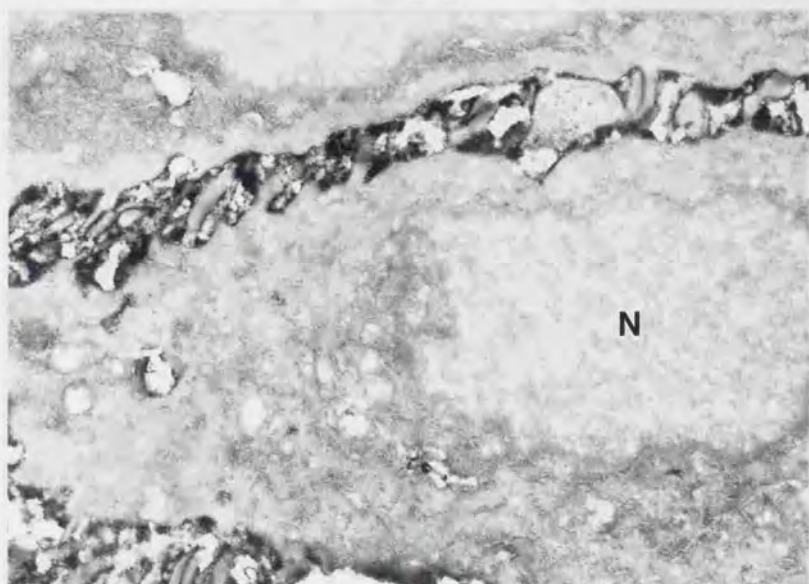


図28 正常下咽頭上皮，SBA染色，電顕写真，細胞膜に強い反応が見られる，N：核， $\times 14,000$ 。

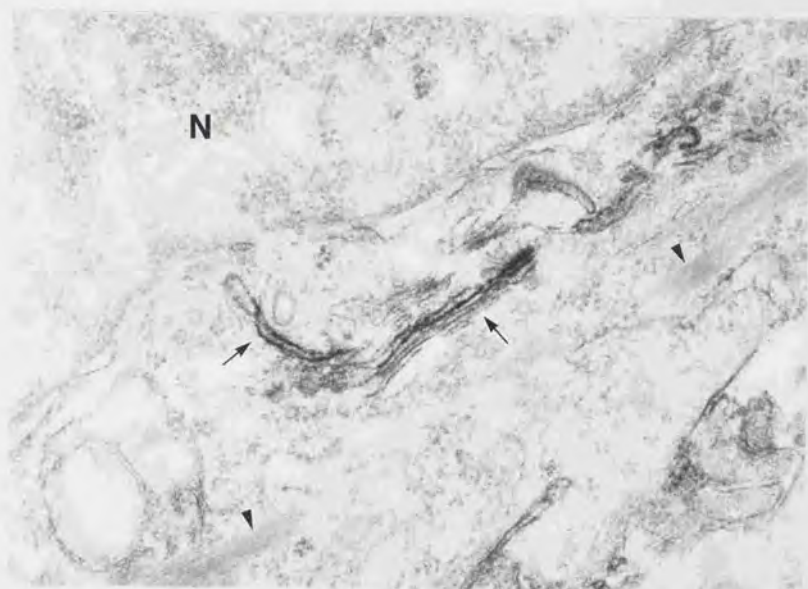


図29 下咽頭扁平上皮癌細胞。WGA染色。電顕写真。細胞膜、ゴルジ膜（矢印）に陽性反応が見られる。N：核。矢尻：トノフィラメント。×59,000。

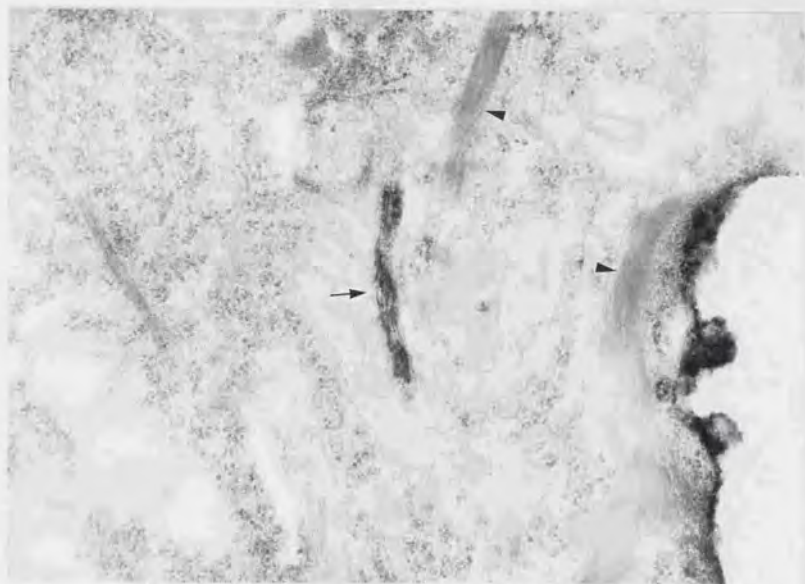


図30 下咽頭扁平上皮癌細胞，PNA染色，電顕写真，細胞膜、ゴルジ膜（矢印）に陽性反応が見られる，矢尻：トノフィラメント， $\times 42,000$ 。

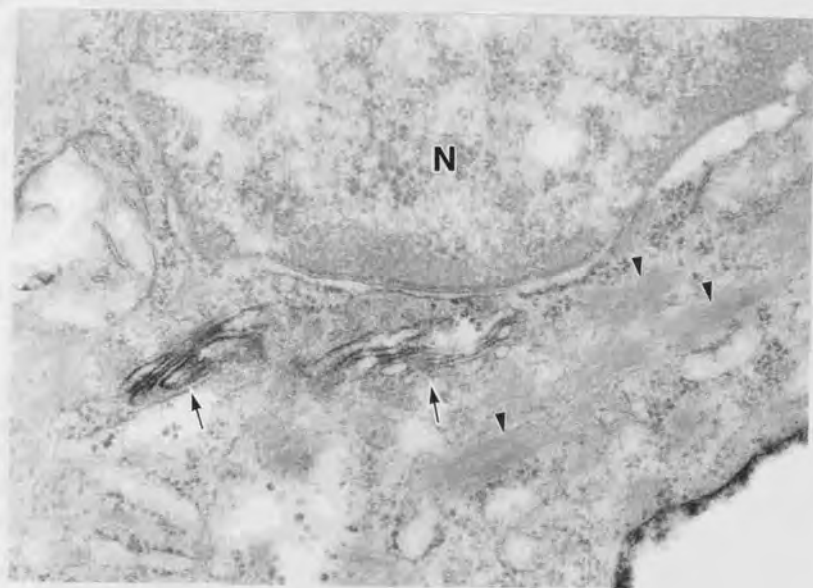


図31 下咽頭扁平上皮癌細胞. SBA染色. 電顕写真. 細胞膜、ゴルジ膜(矢印)に陽性反応が見られる. N:核. 矢尻:トノフィラメント. $\times 50,000$.



