

肺癌組織におけるレクチン結合性

奈良県立医科大学第2内科学教室

福岡和也

LECTIN BINDINGS REVEALED BY SEMI-QUANTITATIVE IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN HUMAN LUNG CANCER

KAZUYA FUKUOKA

The Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received May 28, 1990

Summary: In order to find a cancer specific pattern of lectin bindings, semi-quantitative immunohistochemical analysis using a panel of lectins (DBA, UEA-I, RCA-I, WGA, ConA, PNA) was conducted on fresh-frozen tissue sections of non-cancerous bronchus, metaplastic bronchus and lung cancer. The following results were obtained:

1) In non-cancerous bronchus, the binding distributions of RCA-I, WGA, ConA, and PNA with neuraminidase (PNA • N(+)) were observed in almost all tissue components; in contrast, those of DBA, DBA • N(+), UEA-I, and PNA were localized in bronchial epithelial cells, bronchial glands, and endothelial cells.

2) All the lectins except for PNA bound to the metaplastic bronchial epithelial cells.

3) Almost all the cancerous tissues were positively stained with UEA-I, RCA-I, WGA, ConA, and PNA • N(+). DBA was found to bind adenocarcinomas preferentially to squamous cell carcinomas and small cell carcinomas.

4) Bindings of DBA and UEA-I in lung cancer tended to be correlated with cancer cell differentiation.

5) There were relationships between DBA, UEA-I, RCA-I, and PNA bindings and clinical staging in lung cancer.

6) DBA and UEA-I bindings showed no relationship with ABO blood group status of lung cancer patients.

7) The incidence of the phenotype, PNA, PNA • N(+)+ representing the cryptic PNA binding sites were masked by sialic acids might be correlated with the serum CEA values in squamous cell carcinoma and lymphnodes metastasis.

In conclusion, semi-quantitative lectin immunohistochemistry using DBA, UEA-I, and PNA contributes to the assessment of various abnormalites of glycoconjugates associated with lung cancer.

Index Terms

lectin immunohistochemistry, lung cancer, sialic acid

緒 言

細胞膜表面に存在する糖タンパク、糖脂質は細胞の分

化、増殖および細胞間の相互認識、情報伝達、免疫応答などの生物現象に関わり重要な役割を果たしているが、細胞の癌化に伴って細胞膜表面の糖鎖構造に変化が生じ

ることが知られている¹⁾。

レクチンは特異的糖鎖結合能を有する植物または動物由来のタンパクであり、広い分野で糖鎖構造の解析に用いられている²⁾。腫瘍生物学の領域においてもレクチンは癌化に伴う糖鎖の変化を認識し腫瘍の組織発生、分化の解明および腫瘍組織と炎症、前癌病変との鑑別に有用であるという報告が数多くなされている³⁾⁻¹³⁾。しかし、呼吸器系に関するレクチン結合性の検討は少なく¹⁴⁾⁻²⁰⁾、特に肺癌組織に対するレクチン結合性を包括的、総合的に検討した報告は極めて少ない。

著者は肺癌組織に対するレクチン結合性を組織化学的に検討し、腫瘍特異的なレクチン結合性の検索を行ない、また肺癌組織に対するレクチン結合性と種々の臨床病態との関連性についても検討し新しい知見を得たので報告する。

対 象

対象は手術、剖検および気管支鏡下生検により採取した原発性肺癌 50 例(扁平上皮癌 23 例, 腺癌 19 例, 小細胞癌 8 例)と化生扁平上皮 3 例を含む非癌気管支 10 例である。非癌気管支の内訳は肺癌症例の肉眼的、組織学的正常気管支(健常気管支) 6 例, 慢性気管支炎 2 例, 気管支結核 1 例, 咽頭癌 1 例である。これらの対象症例の

性別、年齢分布および A B O 式血液型を表に示した (Table 1, 2)。

方 法

切除標本または生検組織を採取後、直ちに O. C. T. COMPOUND 4583 (MILES LABORATORIES, INC. Elkhart, Indiana) に包埋し、dry-ice acetone にて凍結、CRYOSTAT を用いて 4 μ m の無固定新鮮凍結切片を作成した。

反応に用いた Fluorescein Isothiocyanate (FITC) またはビオチン標識レクチン (E-Y LABORATORIES, INC. San Mateo, CA) の名称、略称および特異的結合糖鎖を表に示した (Table 3)。

1) FITC 標識レクチンを用いた蛍光法による組織染色

新鮮凍結切片を風乾、4 $^{\circ}$ C で 5 分間 acetone 固定した後、0.01M phosphate buffered saline (PBS), pH7.2 にて洗浄、1% Bovine Serum Albumin (BSA) を含む 0.01M PBS, pH7.45 で 100 μ g/ml に希釈した FITC 標識レクチンと室温で、incubation chamber 内にて 30 分間反応させた。PBS 洗浄後、mounting medium に Perma Fluor[®] (LIPSHAW/Immunon Comp. DETROIT, MI) を用い封入、蛍光顕微鏡 Fluophot

Table 1. Details of lung cancer cases

Histological type	Total no. of cases	Sex		Age distribution (mean)	ABO blood group status				
		Male	Female		A	B	AB	O	NT
Squamous cell carcinoma	23	20	3	47~80 (67)	6	4	4	7	2
Adenocarcinoma	19	9	10	40~81 (63)	4	5	1	8	1
Small cell carcinoma	8	7	1	46~76 (62)	3	1	1	3	—

NT : Not tested

Table 2. Details of the subjects with non-cancerous bronchus

Case No.	Age	Sex	Blood group status	Diagnosis
1	73	Male	A	Lung cancer (squamous cell ca.)
2	54	Male	B	Lung cancer (squamous cell ca.)
3	91	Male	B	Lung cancer (squamous cell ca.)
4	74	Male	AB	Lung cancer (squamous cell ca.)
5	65	Female	O	Lung cancer (adenoca.)
6	77	Male	B	Lung cancer (adenoca.)
7	63	Male	A	Chronic bronchitis
8	57	Female	B	Chronic bronchitis
9	38	Female	O	Broncheal tuberculosis
10	38	Female	A	Pharyngeal cancer

Table 3. Abbreviation and carbohydrate specificity of lectin used

Abbreviation	Lectins/Source	Nominal carbohydrate specificity
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (horse gram)	α -D-Gal NAc
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> (gorse seed)	α -L-Fuc
RCA-I	<i>Ricinus communis</i> (castor bean)	β -D-Gal
WGA	<i>Triticum vulgare</i> (wheat germ)	$[\beta$ -(1-4)-D-GlcNAc] ₂ >Neu5Ac
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> (jack bean)	α -D-Man> α -D-Glc
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> (peanut)	D-Gal- β -(1-3)-Gal NAc

GalNAc : N-acetylgalactosamine, Fuc : fucose, Gal : galactose,
 GlcNAc : N-acetylglucosamine, NeuAc : acetyl-neuraminic acid (sialic acid)
 Man : mannose, Glc : glucose.

(Nikon) を B 励起 (励起フィルター IF420-490, ダイクロミック・ミラー DM505, 吸収フィルター 515 W) に設定し観察した。写真撮影には Microflex UFX-II (Nikon) を用い、フィルムは FUJICHROME RD135, ASA100 を使用した。

蛍光強度を客観的に評価するため、顕微測光装置 P1 (Nikon) を用い蛍光強度を測定した。印加電圧 600HV, 積算回数 20/sec, 倍率 20×10, 測光絞径 0.5mm に設定し、最も強い蛍光を発している細胞にスリットを置き同視野内の細胞を測光した。得られた値と background 値との比率を Intensity Ratio (I. R.) とし、染色結果については、-; I. R. < 1.8, +; 1.8 ≤ I. R. < 2.5, ++; 2.5 ≤ I. R. < 5.0, +++; 5.0 ≤ I. R. と判定基準を設定し、これに従い判定した。

レクチン結合部位を被覆するシアル酸を除去するため、切片を前もって neuraminidase 処理し PNA および DBA の結合性の変化を観察した。Clostridium perfringens type V より得られた neuraminidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) 1 unit を 1%CaCl₂ 100 μl を含む 0.05M sodium acetate buffer, pH5.5 に溶解し、37°C で 30 分間反応させた後 FITC 標識 PNA および DBA と反応させた。neuraminidase 処理後の PNA および DBA の反応を PNA・N(+), DBA・N(+)) として表した。

対照実験として先に示した各種レクチンの特異的結合糖鎖 (E-Y LABORATORIES, INC. San Mateo, CA) を 0.01M PBS, pH7.2 で 0.2M 溶液に溶解し、それに等量の各種レクチン溶液を加えたものと反応させ、レクチンと組織との結合の特異性を確認した。

2) ビオチン標識レクチンを用いた avidin biotin peroxidase complex method (ABC 法による) による組織染色。

手術切除組織のうち 32 例 (扁平上皮癌 16 例, 腺癌 15 例, 小細胞癌 1 例) を対象としてビオチン標識レクチン

を用いた ABC 法により組織染色を行ない、FITC 標識レクチンを用いた蛍光法と染色性を比較した。

新鮮凍結切片を風乾, acetone 固定後, 内因性 peroxidase 活性阻止のため 0.3% 過酸化水素を含む methanol と室温で 30 分間反応させ、PBS 洗浄後、1% BSA を含む 0.01M PBS, pH7.45 で各濃度に希釈したビオチン標識レクチン (DBA 25μg/ml, UEA-I 50μg/ml, PNA 25μg/ml) と室温で、incubation chamber 内にて 1 時間反応させた。但し、PNA に関しては予め前述の neuraminidase 処理を行なってから反応を行なった。PBS 洗浄後、ABC 試薬をキット (VECTASTAIN® ABC KIT, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) で指定された濃度に 0.01M PBS, pH7.45 で調整し、室温で、incubation chamber 内にて 30 分間反応させた。PBS 洗浄後、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) で発色、水洗後ヘマトキシリンにて核染色し封入、観察を行なった。対照実験は 1) に述べた方法で行ない、染色結果の判定は Macartney²¹⁾ の基準を参考にして 1 切片内の全腫瘍細胞のうちで染色された腫瘍細胞の占める割合によって、-; 0%, +; < 25%, ++; 25-75%, +++; > 75% と設定し判定した。

なお、本研究における統計学的処理には、 χ^2 検定および Student の t 検定を用いた。

結 果

10 例の肺癌組織を対象として無固定と acetone 固定切片について FITC 標識レクチンの染色性を比較した結果、両者の間でレクチン結合部位、結合様式に差異を認めなかったが、一部の症例では無固定切片で染色性の不明瞭なものがみられたために、全例 acetone 固定を行なった。以下に述べる 1) から 7) の結果は FITC 標識レクチンを用いた蛍光法により得られたものであり、(+)) 以上を陽性例とした。

1) 健常気管支組織に対するレクチン結合性について

健常気管支組織に対する各種レクチン結合性について RCA-I, WGA, ConA は気管支上皮, 基底膜, 弾性線維束, 血管内皮, 平滑筋層, 気管支腺, 軟骨などの各組織と強く結合した。UEA-I は基底細胞層を中心とした気管支上皮, 血管内皮, 気管支腺との結合がみられた。一方, DBA は気管支上皮と気管支腺にのみ陽性であっただけで他の組織には結合しなかった。これは DBA・N(+) においてもほぼ同様であった。PNA は気管支上皮, 弾性線維束, 軟骨とわずかに結合したが他の組織は陰性であった。しかし, PNA・N(+) では PNA に比べてすべての組織において反応性の増強がみられた (Table 4, Fig. 1 a, b)。

扁平上皮化生をきたした化生気管支上皮に対するレクチン結合性について, PNA を除くすべてのレクチンが化生上皮の細胞膜を中心に (+) から (++) の陽性を示した。RCA-I, WGA, ConA, PNA・N(+) は化生上皮層が全層にわたり均一に染色されたのに対して, DBA, DBA・N(+), UEA-I は管腔面に近い表層細胞よ

りも基底膜に近い立方形ないし多角形細胞が強く染色される傾向にあり, 各種レクチン間で結合部位の局在に多少の相違が認められた (Table 5, Fig. 2)。また, preliminary な細気管支上皮の検索では線毛上皮細胞と無線毛上皮細胞との間で明かなレクチン結合性の相違は認められなかった。

2) 各組織型の肺癌組織に対するレクチン結合性について

a) 扁平上皮癌

RCA-I, WGA, ConA, PNA・N(+) は全例陽性で, 特に WGA, ConA, PNA・N(+) の陽性例は大部分が (++) から (+++) であり強い結合を示した。UEA-I は腫瘍細胞膜を中心として一部細胞質にも結合し, 陽性率は 95.7% (22/23) であった。DBA および DBA・N(+), PNA の陽性率はそれぞれ 43.5% (10/23), 30.4% (7/23) であり, 他のレクチンの陽性率に比較して有意に低かった ($P < 0.01$) (Table 6)。

結合部位の局在は腫瘍細胞膜表面を中心として一部細

Table 4. Distribution of lectin binding sites in non-cancerous bronchus

organs	DBA	DBA・N(+)	UEA-I	RCA-I	WGA	ConA	PNA	PNA・N(+)
Bronchial Epithelium	+	+	##~+	##~+	##	##	--~+	##~+
Basement Membrane	-	-	-	##~+	##~+	##	-	+~##
Elastic Bundles	-	-	--~+	##	##	##	--~+	##~+
Endothelial Cells	-	+~-	##~-	##	##	##	-	+~##
Muscular Layer	-	-	-	##~+	##	##	-	+~##
Bronchial Glands	##~+	##	##~+	##	##	##	-	+~##
Cartilage	-	-	-	##~+	##	##	+~-	##

- ; I.R. < 1.8, + ; 1.8 ≤ I.R. < 2.5, ## ; 2.5 ≤ I.R. < 5.0, ### ; 5.0 ≤ I.R.

Table 5. Lectin binding in metaplastic bronchial epithelium

DBA	DBA・N(+)	UEA-I	RCA-I	WGA	ConA	PNA	PNA・N(+)
+~##	+	##	##	##	##	--~+	##

- ; I.R. < 1.8, + ; 1.8 ≤ I.R. < 2.5, ## ; 2.5 ≤ I.R. < 5.0, ### ; 5.0 ≤ I.R.

Table 6. FITC-conjugated lectin binding in squamous cell carcinoma

	DBA	DBA・N(+)	UEA-I	RCA-I	WGA	ConA	PNA	PNA・N(+)
-	13	16	1	0	0	0	16	0
+	8	4	3	9	2	1	2	2
##~##	2	3	19	14	21	22	5	21
positivity (%)	10 (43.5)**	7 (30.4)**	22 (95.7)	23 (100)	23 (100)	23 (100)	7 (30.4)**	23 (100)

- ; I.R. < 1.8, + ; 1.8 ≤ I.R. < 2.5, ## ; 2.5 ≤ I.R. < 5.0, ### ; 5.0 ≤ I.R.

** Significantly different from UEA-I, RCA-I, WGA, ConA, PNA・N(+) by the χ^2 test ($P < 0.01$).

胞質にも存在し、壊死組織は濃染される傾向にあった (Fig. 3).

b) 腺癌

扁平上皮癌と同様, RCA-I, WGA, ConA, PNA・N (+) は全例陽性であり, 特に WGA, ConA, PNA・N (+) の陽性例は大部分もしくは全例が (++) から (+++) であった. UEA-I も 1 例のみが陰性で陽性率は 94.7% (18/19) と高率であった. DBA に関しては (+) と (++)・(+++) が 8 例ずつで陽性率は 84.2% (16/19) であった. PNA の陽性率は 57.9% (11/19) で DBA を除いたレクチンの陽性率と比較して有意に低かった (P<0.01). neuraminidase 処理により PNA の結合性は有意に増強したが, DBA の結合性は 4 例で低下した (Table 7).

結合部位の局在は腫瘍細胞膜表面および細胞質にも同程度にみられた. また, 腫瘍細胞により形成された腺腔の管腔面に強く結合する症例もみられ, 扁平上皮癌と比較して結合部位の局在に多様性が認められた (Fig. 4).

C) 小細胞癌

UEA-I, RCA-I, ConA, PNA・N(+) は全例陽性で, 特に ConA と PNA・N(+) は全例 (++) から (+++) を示した. WGA は 1 例のみ陰性で陽性率は 87.5% (7/8) であった. DBA および DBA・N(+) は 1 例に (+) がみられたのみで, 陽性率は 12.5% (1/8) で

PNA を除く他のレクチンの陽性率と比較して有意に低かった (P<0.01) (Table 8).

結合部位の局在は腫瘍細胞膜表面が中心であったが, 細胞質が顆粒状, びまん性に染色された症例もみられた (Fig. 5).

以上, 肺癌各組織型によるレクチン結合性の相違を検討した結果, DBA は他のレクチンと比較して組織型の違いによりその結合性に若干の相違が認められた. すなわち, 組織型別の DBA の陽性率は扁平上皮癌 43.5% (10/23), 腺癌 84.2% (16/19), 小細胞癌 12.5% (1/8) であり, 腺癌の陽性率が他の組織型と比較して有意に高率であった (扁平上皮癌 P<0.05, 小細胞癌 P<0.01) (Table 9).

3) 腫瘍分化度別のレクチン結合性について

扁平上皮癌, 腺癌の分化度別にレクチン結合性の相違を比較検討した. 扁平上皮癌 23 例では高分化型は 1 例のみで中分化型, 低分化型がそれぞれ 11 例ずつであったので中分化型と低分化型とを比較した. UEA-I の陽性率が低分化型よりも中分化型で高い傾向にあったが, 他のレクチンでは両群間で有意な差異を認めなかった. 腺癌 19 例では高分化型 8 例, 中分化型 6 例, 低分化型 5 例であった. DBA および DBA・N(+) の陽性率が高分化型および低分化型に比較して中分化型で低い傾向にあったが, 他のレクチンでは 3 群間で有意な差異を認めなかつ

Table 7. FITC-conjugated lectin binding in adenocarcinoma

	DBA	DBA・N(+)	UEA-I	RCA-I	WGA	ConA	PNA	PNA・N(+)
-	3	7	1	0	0	0	8	0
+	8	4	7	6	2	2	7	0
++~##	8	8	11	13	17	17	4	19
positivity (%)	16 (84.2)	12 (63.2)	18 (94.7)	19 (100)	19 (100)	19 (100)	11 (57.9)**	19 (100)

- ; I.R.<1.8, + ; 1.8≤I.R.<2.5, ++ ; 2.5≤I.R.<5.0, ## ; 5.0≤I.R.

** Significantly different from UEA-I, RCA-I, WGA, ConA, PNA・N(+) by the χ^2 test (P<0.01).

Table 8. FITC-conjugated lectin bindings in small cell carcinoma

	DBA	DBA・N(+)	UEA-I	RCA-I	WGA	ConA	PNA	PNA・N(+)
-	7	7	0	0	1	0	3	0
+	1	1	3	2	0	0	2	0
++~##	0	0	5	6	7	8	3	8
positivity (%)	1 (12.5)**	1 (12.5)**	8 (100)	8 (100)	7 (87.5)	8 (100)	5 (62.5)	8 (100)

- ; I.R.<1.8, + ; 1.8≤I.R.<2.5, ++ ; 2.5≤I.R.<5.0, ## ; 5.0≤I.R.

** Significantly different from UEA-I, RCA-I, WGA, ConA, PNA・N(+) by the χ^2 test (P<0.01).

た (Fig. 6 a,b).

4) 癌細胞と間質のレクチン結合性について

各種レクチン陽性例のうち、病理組織学的に癌細胞とその周囲をとり囲む間質とを明確に区別し得る症例につ

いて、癌細胞と間質の蛍光強度を比較した。DBA, DBA・N(+), UEA-I では大部分の症例で間質よりも癌細胞に強い蛍光強度が得られたのに対し、RCA-I, WGA, ConA, PNA・N(+)ではその逆に癌細胞よりも間質に

Table 9. FITC-conjugated DBA binding in lung cancer

	Squamous cell ca. (n=23)	Adenoca. (n=19)	Small cell ca. (n=8)
-	13	3	7
+	8	8	1
##~###	2	8	0
positivity (%)	10 (43.5)*	16 (84.2)	1 (12.5)**

- : I.R.<1.8, + : 1.8≤I.R.<2.5, # : 2.5≤I.R.<5.0, ## : 5.0≤I.R.

* Significantly different from Adenoca. by the χ^2 test (P<0.05).

** Significantly different from Adenoca. by the χ^2 test (P<0.01).

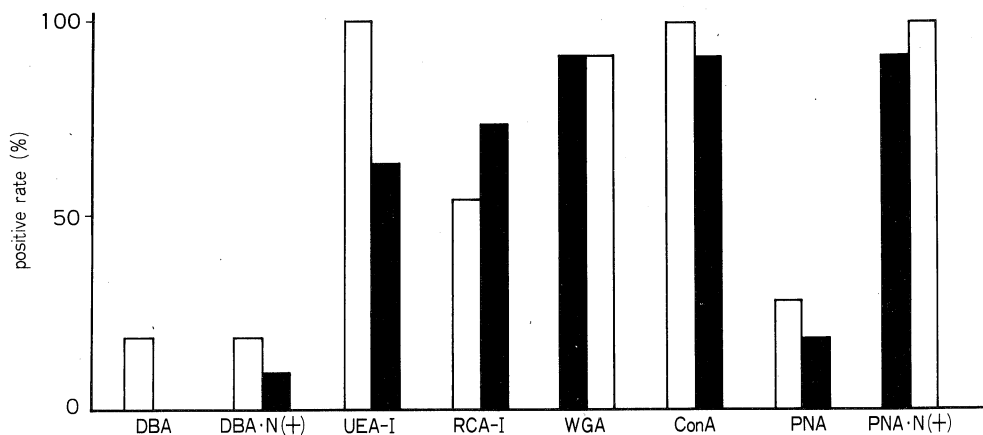


Fig. 6. (a) Lectin bindings and cancer cell differentiation of squamous cell carcinoma. □moderately differentiated ■poorly differentiated

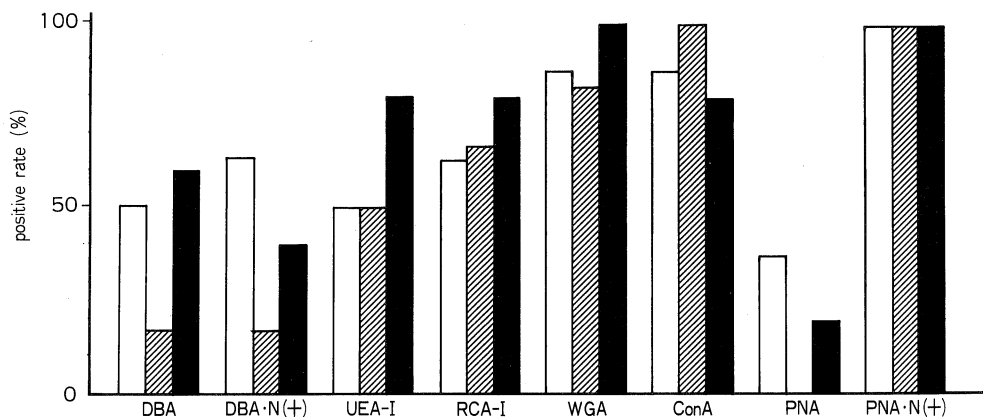


Fig. 6. (b) Lectin bindings and cancer cell differentiation of adenocarcinoma. □well differentiated ▨moderately differentiated ■poorly differentiated

強い蛍光がみられた (Table 10).

小 括

1. 健常気管支における DBA, DBA・N(+), UEA-I, PNA の結合部位は主として気管支上皮, 腺, 血管内皮に限局していた.
2. 扁平上皮化生をきたした気管支上皮には PNA を除くすべてのレクチンが結合した.
3. 肺癌組織において UEA-I, RCA-I, WGA, ConA, PNA・N(+) は高い陽性率を示した. 扁平上皮癌では DBA, DBA・N(+), および PNA の陽性率は他のレクチンに比較して有意に低率であった. 腺癌では PNA の陽性率は DBA を除いたレクチンに比較して有意に低率であった. 小細胞癌では DBA, DBA・N(+), の陽性率は PNA を除くレクチンに比較して有意に低率であった. DBA に関して腺癌に対する陽性率は他の組織型に比較して有意に高率であった.
4. レクチン結合性の局在は細胞膜を中心として一部細胞質にもみられたが, 腺癌の結合部位の局在は扁平上皮癌に比べて多様であった.
5. neuraminidase 処理によるシアル酸除去の結果, DBA の反応性に変化はなかったが PNA の反応性はすべての組織で増強した.

6. 腫瘍分化度により DBA と UEA-I の結合性には異なる傾向を認めた.

7. 蛍光強度は DBA, DBA・N(+), UEA-I に関しては間質よりも癌胞巣に強かった.

5) ABO 式血液型別のレクチン結合性について

ABO 式血液型の判明した 47 例 (A 型 13 例, B 型 10 例, AB 型 6 例, O 型 18 例) に関して, 血液型関連抗原を認識する A 型特異的レクチン DBA と H(O) 型特異的レクチン UEA-I の結合性と ABO 式血液型との関連性を検討した. 各血液型間で DBA および UEA-I の陽性率に有意な差異を認めなかった. A 型症例のうち DBA 陰性でかつ UEA-I 陽性の症例が 46.2% (6/13) にみられ, O 型症例は全例 UEA-I 陽性であった. また, B 型, AB 型, O 型症例における DBA 陽性率はそれぞれ 70.0% (7/10), 66.7% (4/6), 50.0% (9/18) であった (Table 11). なお, 非癌気管支組織においては宿主の血液型と DBA および UEA-I の結合性との間に明らかな関連性を認めなかった.

6) 臨床病期とレクチン結合性について

非小細胞肺癌手術切除例のうち術後病期の確定した 34 例について T 因子, N 因子にレクチン結合性を検討した. T 因子については壁側胸膜および隣接臓器への浸潤のない T₁, T₂ 群 24 例と浸潤のある T₃, T₄ 群 10 例とに

Table 10. Comparison of lectin binding intensity between cancer nests and neoplastic stroma

	Number of cases							
	DBA	DBA・N(+)	UEA-I	RCA-I	WGA	ConA	PNA	PNA・N(+)
Cancer nests > Neoplastic stroma	24	18	37	4	10	3	12	7
Cancer nests = Neoplastic stroma	3	2	4	5	12	3	4	3
Neoplastic stroma > Cancer nests	0	0	3	40	26	43	6	38

Table 11. Relation between ABO blood group status and FITC-conjugated DBA and UEA-I binding in lung cancer

Blood group status	No. of cases	No. of positive cases (%)	
		DBA	UEA-I
A*	13	6 (46.2)	12 (92.3)
B	10	7 (70.0)	9 (90.0)
AB	6	4 (66.7)	6 (100)
O	18	9 (50.0)	18 (100)

*DBA-, UEA-I+ : 6/13 (46.2)

分け、またN因子についてはリンパ節転移のないN₀群 20例と肺門、縦隔または鎖骨上窩リンパ節転移のあるN₁, N₂, N₃群 14例とに分けた。DBAとDBA・N(+)に関してはT₃, T₄群, N₁₋₃群の方がT₁, T₂群, N₀群に比べて陽性率が高い傾向にあったが、UEA-Iに関してはその逆であった。また、RCA-Iに関してはT₁, T₂群の方がT₃, T₄群よりも、N₁₋₃群の方がN₀群よりも陽性率が高い傾向にあったが、PNAに関してはその逆であった。しかし、これらの間には統計学的に有意な相関を認めなかった (Fig. 7 a,b)。

また、シアル酸とリンパ節転移の関連性を検討するためシアル酸の存在によってPNA結合部位が被覆されている表現型PNA⁻, PNA・N(+)⁺の比率をN₀群とN₁₋₃群とで比較した結果、N₀群 55% (11/20), N₁₋₃群 78.6% (11/14)でありN₁₋₃群に高い傾向にあった。

7) 血中CEA値とレクチン結合性について
術前血中CEA値 (ELISA法, cut-off値 6.4ng/ml)

を測定し得た非小細胞肺癌31例をCEA高値群 group A (CEA ≥ 6.4ng/ml) 14例とCEA正常群 group B (CEA < 6.4ng/ml) 17例の2群に大別し各種レクチン結合性との関連を検討した。血中CEA値の平均値±標準偏差はgroup Aが13.6±11.7ng/ml, group Bが4.1±1.5ng/mlでありgroup Aがgroup Bに比較して有意に高値を示し(P < 0.02), 各種レクチン結合性に関しては両群間で有意な差異を認めなかったが (Table 12), シアル酸の存在によってPNA結合部位が被覆されている表現型PNA⁻, PNA・N(+)⁺の比率だけをみるとgroup A 85.7% (12/14), group B 47.1% (8/17)でgroup Aに高い傾向にあり、特に扁平上皮癌においては有意に高率であった (P < 0.05) (Table 13)。

8) ビオチン標識レクチンを用いたABC法による肺癌組織に対するレクチン結合性について

扁平上皮癌では陽性率はDBA 25.0% (4/16), UEA-I 100% (16/16), PNA・N(+)⁺ 93.8% (15/16) であ

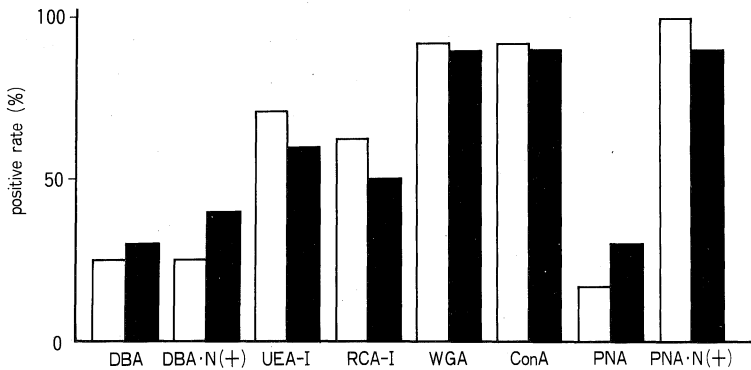


Fig. 7. (a) Lectin bindings and T factor in non small cell lung cancer. □ T₁, T₂ (n=24) ■ T₃, T₄ (n=10)

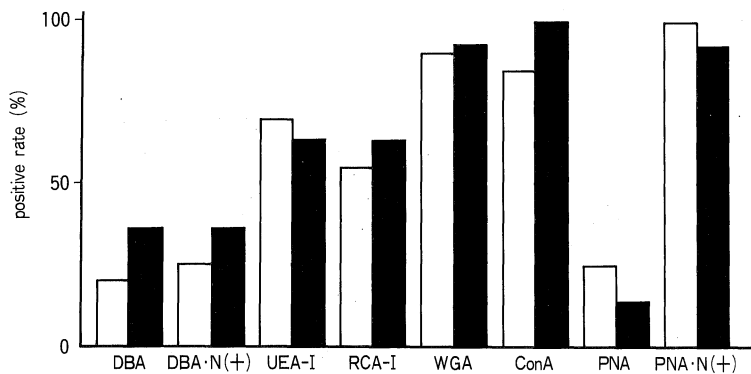


Fig. 7. (b) Lectin bindings and N factor in non small cell lung cancer. □ N₀ (n=20) ■ N_{1,2,3} (n=14)

り、DBA の陽性率は UEA-I, PNA・N(+) に比較して有意に低率であった (P<0.01)。腺癌では陽性率は DBA 60.0%(9/15), UEA-I 93.3%(14/15), PNA・N(+) 100%(15/15) であり、DBA の陽性率は PNA・N(+) に比較して有意に低率であった、(P<0.05)。小細胞癌は 1 例のみであるが、UEA-I が陽性、DBA, PNA・N(+) が陰性であった (Table 14, Fig. 8 a,b)。FITC 標識レクチンを用いた蛍光法との比較では、UEA-I と PNA・N(+) の陽性率は両方法間で明らかな差異を認めなかったが DBA の陽性率は蛍光法に比べて ABC 法で低い傾向にあった。

小 括

1. 血液型別レクチン結合性の検討では各血液型間で DBA および UEA-I の陽性率に有意な差異はみられなかった。A 型症例で DBA 陰性かつ UEA-I 陽性例を認めしたが、O 型症例は全例 UEA-I 陽性であった。また、B 型および O 型症例で DBA 陽性例を認めた。
2. 臨床病期との関連では DBA, UEA-I, RCA-I, PNA 結合性は一部、関連傾向を認めた。シアル酸との関連で

は PNA⁻, PNA・N(+)⁺ の比率は N₀ 群に比較して N₁₋₃ 群で高い傾向にあった。

3. 扁平上皮癌における PNA⁻, PNA・N(+)⁺ の比率は血中 CEA 正常群に比較して高値群で有意に高率であった。

4. ビオチン標識レクチンを用いた ABC 法との比較では DBA の陽性率は蛍光法に比べて ABC 法で低い傾向にあ

Table 13. Relation between serum CEA values and incidence of the phenotype of PNA⁻, PNA・N(+)⁺

	Total (n=31)	Squamous cell ca. (n=19)	Adenoca. (n=12)
Group A CEA ≥6.4ng/ml (n=14)	12/14 (85.7)	8/8 (100)*	4/6 (66.7)
Group B CEA <6.4ng/ml (n=17)	8/17 (47.1)	6/11 (54.5)	2/6 (33.3)

*Significantly different from Group B by the χ^2 test (P<0.05).

Table 12. Relation between serum CEA values and FITC-conjugated lectin binding in non small cell lung cancer

	Serum CEA M±SD (ng/ml)	DBA	DBA・ N(+)	UEA-I	RCA-I	WGA	ConA	PNA	PNA・ N(+)
Group A CEA ≥6.4ng/ml (n=14)	13.6±11.7**	10 (71.4)	7 (50.0)	13 (92.9)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	2 (14.3)	14 (100)
Group B CEA <6.4ng/ml (n=17)	4.1±1.5	9 (52.9)	9 (52.9)	17 (100)	17 (100)	17 (100)	17 (100)	9 (52.9)	17 (100)

**Significantly different from Group B by the Student's t test (P<0.02).

Table 14. Biotinylated lectin binding in lung cancer

	Squamous cell ca. (n=16)			Adenoca. (n=15)			Small cell ca. (n=1)		
	DBA	UEA-I	PNA・ N(+)	DBA	UEA-I	PNA・ N(+)	DBA	UEA-I	PNA・ N(+)
-	12	0	1	6	1	0	1	0	1
+	1	1	5	6	1	4	0	0	0
##~###	3	15	10	3	13	11	0	1	0
positivity (%)	4 (25.0)**	16 (100)	15 (93.8)	9 (60.0)*	14 (93.3)	15 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)

- : negative, + ; <25% cells stained, ## ; 25~75% cells stained, ### ; >75% cells stained

**Significantly different from UEA-I, PNA・N(+) by the χ^2 test (P<0.01).

*Significantly different from PNA・N(+) by the χ^2 test (P<0.05).

った。

考 察

1) 固定・染色法と評価方法

著者はすべて新鮮材料から作成した凍結切片を用いて染色を行ない無固定と acetone 固定した切片との比較からは acetone 固定によるレクチン結合性に対する影響はないものと考えられた。この結果は Örnftoft²²⁾のヒト表皮に対する PNA 結合性を種々の固定法の面から検討した報告と一致していた。したがって本研究では組織の固定、処理によるレクチン結合部位の修飾は殆どないと考えられた。

染色法に関しては凍結切片を用いた場合に適しているとされる FITC 標識レクチンによる直接法²³⁾を全例に適用した。また、一部の症例ではビオチン標識レクチンを用いた ABC 法を適用した。ABC 法は蛍光法に比べてヘマトキシリンで核染色を施しているため組織構築を明瞭に観察することができる²³⁾。レクチン結合性に関して UEA-I と PNA・N(+) は両方法間で明かな差異はみられなかったが DBA の陽性率だけは ABC 法において蛍光法より低い傾向にあった。したがって、本研究の条件下における DBA 結合性に関して感度の面からは FITC 標識レクチンを用いた蛍光法がビオチン標識レクチンを用いた ABC 法よりも勝ると考えられた。このように、レクチン組織化学の手法により各組織のレクチン結合性を比較検討する際には、組織の固定、処理等の条件や染色法が同一である研究を比較することが重要であると考えられる。

FITC 標識レクチンを用いた蛍光法によるレクチン組織化学の蛍光強度の判定はこれまで主観的評価に頼らざるを得なかったが、本研究では顕微測光装置を用い腫瘍細胞の蛍光強度を測定し客観的かつ統一的に評価することができた。顕微測光法は蛍光抗体法染色標本の相対的な蛍光強度を定量的に表現することが可能であり、一定の閾値を設定することにより特異蛍光と非特異的背景染色とを区別することもできるとされる²⁴⁾。医学・生物学の分野への応用は DNA, RNA, タンパク含量の定量、蛍光抗体測光解析、細胞内微量元素および生体内モノアミン測定など多岐に及ぶが、レクチン組織化学に用いられた報告はこれまでになく、本研究が初めての試みである。

2) 正常・化生・腫瘍組織におけるレクチン結合性

上皮細胞の化生性および悪性変化については形態的観察以外にも、レクチン組織化学を用いた糖鎖構造の面からも解析が行なわれ、これらの組織発生や細胞生物学的特性を解明する試みがなされており、結腸・直

腸³⁾⁴⁾⁵⁾²⁵⁾²⁶⁾、膵臓²⁷⁾、食道²⁸⁾、乳腺⁶⁾⁷⁾⁸⁾、子宮⁹⁾²⁹⁾、膀胱³⁰⁾、前立腺¹⁰⁾、表皮¹¹⁾¹²⁾などで正常、前癌病変、および腫瘍組織間のレクチン結合性の相違が比較検討されている。呼吸器系に関しては正常気管支¹⁴⁾や発癌物質の暴露を受けた気管支粘膜¹⁵⁾の杯細胞および気管支腺細胞の分泌する粘液糖タンパクのレクチン組織化学による解析の報告はみられるが、肺癌組織に対するレクチン結合性の研究は僅かである^{16)~20)} (Table 15)。これらの報告においては健常気管支に関する検討は少なく、また各組織型の肺癌組織に対する各種レクチン結合性に関する包括的な評価は行なわれていない。Shiba ら¹⁶⁾はヒト正常気管支上皮、扁平上皮化生、異形成と 17 例の肺癌組織のホルマリン固定パラフィン切片に対して WGA, ConA, RCA の結合性を比較した結果、WGA は全く結合がみられなかったが ConA はいずれの組織にも結合し、RCA は異形成と肺癌組織の 41.2% にのみ結合したと報告し、RCA が呼吸器系の前癌病変に対してより信頼性と特異性のあるマーカーであるとしているが、凍結切片を用い本研究においては健常気管支、化生気管支上皮、肺癌組織に対する WGA, ConA, RCA-I の結合性はいずれも高く、またその結合性に有意な差異は認められず Shiba らの報告とは一致しなかった。また、Yoneda ら²⁰⁾の気管支鏡下生検材料の無固定凍結切片を用いた検討では DBA は肺癌組織に高率に陽性を示した。Kawai ら¹⁷⁾は高分化型腺癌と悪性中皮腫のレクチン結合性を比較し SucWGA と RCA-I が腺癌に高率に陽性であったことから、これらのレクチンが両疾患の鑑別に有用であると報告している。彼らの研究では対象が腺癌のみでホルマリン固定パラフィン切片を用いていることが本研究と異なるが、肺癌組織に対する UEA-I, RCA-I, WGA, PNA・N(+) の高い陽性率は著者の結果とほぼ一致していた。本研究では RCA-I, WGA, ConA は健常気管支、化生気管支および腫瘍組織のいずれにも高率に結合したが、DBA, UEA-I, PNA の健常気管支に対する結合性は、DBA が気管支上皮、気管支腺に UEA-I が気管支上皮、気管支腺、血管内皮に PNA が気管支上皮、弾性線維束、軟骨に認められたのみで、これらのレクチンの組織結合性は比較的選択性が高く、これは従来の報告にはなく新しく得られた知見と言える。また、ヒトの各健常組織におけるレクチン結合部位の分布の検索では DBA は胃と結腸の一部組織と結合したにすぎず、DBA の組織結合性の高い選択性が実証されている²⁰⁾。

PNA と DBA に関しては、neuraminidase 処理によるシアル酸除去後の結合性の変化を検討した。PNA は二糖である β -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc に特異的に結

Table 15. Previous lectin histochemical studies of lung cancer

Authors	Tissue preparation		Staining procedure	Histology	No. of cases	No. of positive cases							PNA ⁺ N(+)	
	Fixation	Section				DBA	UEA-I	RCA-I	WGA	ConA	PNA			
Shiba ⁽⁶⁾ 1984	10% buffered formaldehyde	paraffin-embedded section	direct fluorescent staining with FITC-conjugated lectins	Sq	8			3/8	0/8	8/8				
				Ad	6			3/6	0/6	6/6				
				La	2			1/2	0/2	2/2				
				Sm	1			0/1	0/1	1/1				
Hirohashi ⁽⁸⁾ 1984	formalin	paraffin-embedded section	ABC method with biotinylated lectin	Ad	42		34/42							
Yoneda ⁽²⁰⁾ 1987	—	frozen section	direct fluorescent staining with FITC-conjugated lectin		20	20/20								
Kawai ⁽⁷⁾ 1988	formalin	paraffin-embedded section	ABC method with biotinylated lectins	Ad	28	2/28	13/28	26/28	25/28			4/28	27/28	
Fukuoka 1990	acetone	frozen section	direct fluorescent staining with FITC-conjugated lectins	Sq	23	10/23	22/23	23/23	23/23	23/23		7/23	23/23	
				Ad	19	16/19	18/19	19/19	19/19	19/19		11/19	19/19	
				Sm	8	1/8	8/8	8/8	7/8	8/8		5/8	8/8	
			ABC method with biotinylated lectins	Sq	16	4/16	16/16						15/16	
				Ad	15	9/15	14/15						15/15	
				Sm	1	0/1	1/1						0/1	

ABC : avidin-biotin-peroxidase complex, Sq : squamous cell ca., Ad : adenoca., La : large cell ca., Sm : small cell ca.

合する。この糖鎖はいわゆるT抗原の抗原決定基と考えられ、またこれはヒトのMN血液型物質の前駆物質とされる。T抗原は赤血球膜上ではシアル酸に被覆されており、neuraminidase処理によってシアル酸を除去することによりT抗原が露出しPNAと結合することができる³⁰⁾³¹⁾。シアル酸除去により健常気管支上皮、肺癌組織におけるPNAの結合性が增強したことにより、これらの組織ではシアル酸によってPNA結合部位が被覆されているものと考えられる。しかし、PNA陽性例、すなわちPNA結合部位がシアル酸により被覆されていない症例は健常気管支、化生気管支上皮ではごく一部であるのに対し、肺癌組織では46% (23/50)にみられ、これらの肺癌組織ではPNA結合部位が露出しており、癌化に伴うシアル酸付加のない不完全な糖鎖合成を反映しているものと考えられる。一方、DBAの結合性はいずれの組織においてもシアル酸除去により有意な変化を示さず、DBA結合部位はシアル酸により被覆されている可能性は少ないと考えられる。DBA結合部位は健常気管支では気管支上皮および気管支腺にみられたが、肺癌組織においては組織型によりその結合性に相違がみられた。すなわち、FITC標識レクチンを用いた蛍光法ではDBA陽性率は腺癌に比較して扁平上皮癌、小細胞癌で有意に低く、これらの組織型の肺癌組織におけるDBA結合部位の減少が示唆される。腺癌とは異なり扁平上皮癌と小細胞癌ではDBAにより認識される糖鎖構造が消失している可能性が推測され、肺癌の組織発生や細胞生物学的特性を考える上で興味深い。レクチン結合部位の局在に関しては、健常気管支、化生気管支上皮、肺癌組織において明かな相違はみられず、基本的には細胞膜を中心として一部細胞質にも存在していた。しかし、肺癌組織間では、腺癌で管腔面が強く染色された症例や小細胞癌で細胞質内が顆粒状に染色された症例もあり、扁平上皮癌に比べて結合部位の局在に多様性がみられた。この原因としては扁平上皮癌と異なり腺癌には多くの組織型および細胞型が存在することや小細胞癌は神経内分泌顆粒を有することなども関連していると考えられた³²⁾。

3) 腫瘍分化度とレクチン結合性

細胞および組織の発生・分化過程において膜表面の糖鎖構造には変化が生じ、レクチンを用いた解析が行なわれている。DBAおよびPNAにより認識される糖鎖はembryonal carcinoma (EC)細胞や胎児胸腺細胞の分化過程において発現、消失しこれらのレクチンは分化を認識するマーカーとされている^{33)~35)}。著者の成績では、扁平上皮癌の分化度が高くなるに従いUEA-Iの陽性率が上昇傾向にあり、また腺癌におけるDBAの陽性率は

高、低分化型より中分化型で低い傾向にあった。一方、他の腫瘍組織における分化度とレクチン結合性の変化に関しては、結腸癌で分化度が高くなるに従いRCAとPNA結合部位が増加し²⁵⁾、乳癌では浸潤傾向が強くなる予後の悪い低分化型ほどPNA結合部位が減少するとされ³⁶⁾、また乳癌、胃癌、結腸癌におけるPNA結合部位は高分化型では粘液や管腔面であるのに対し、低分化型では細胞質が優位となると報告されている³⁷⁾。

4) 間質のレクチン結合性

著者の研究ではDBA, DBA・N(+), UEA-Iは癌細胞巢に選択的に結合したが他のレクチンでは癌細胞巢周囲の間質にむしろ強く結合した。また、大部分の症例でneuraminidase処理後、間質に対するPNA結合性が增強していることより癌細胞巢周囲の間質にもシアル酸が含まれておりPNA結合部位が被覆していることが示唆された。間質は内在性GlcNAcを含むヒアルロン酸や線維芽細胞、上皮細胞とコラーゲン線維との接着に関与するフィブロネクチンやラミニンなどの細胞外糖タンパクにより構成されているが²⁾³⁸⁾、癌細胞巢周囲の間質に対するレクチン結合性については肺癌での報告はみられず、乳癌³⁸⁾ではConA, WGA, RCA, PNA、皮膚の基底細胞癌³⁹⁾ではBSA-I, PNA、子宮癌²⁾ではLCAなどのレクチン結合性が認められている。

5) ABH血液型物質とレクチン結合性

腫瘍組織においてA, B, H(O)型血液型物質の発現に変化をきたすことが知られている⁴⁰⁾⁴¹⁾。最も一般的な変化としては、1) A, B型決定基の消失ないし減少とそれに伴うH型決定基、I抗原などの前駆物質の集積¹⁸⁾⁴²⁾⁴³⁾、2)遺伝学的に規定される血液型と一致しない血液型物質の発現^{44)~46)}などが挙げられる。1)の現象は糖鎖合成にかかわる糖転移酵素の不活性化による血液型物質の不完全な合成であり、2)の現象は新たな糖転移酵素の誘導による異常な血液型物質の発現と考えられ、これらの酵素を調節する遺伝子レベルでの癌化に関連した現象とされる。癌化に伴う血液型物質の変化については乳癌⁴²⁾、胃癌²⁾⁴⁷⁾、結腸癌⁴⁸⁾などで臨床的研究が進み、血液型物質の消失と腫瘍のもつ生物学的悪性度や病期、予後との関連性の異同についても検討されている。

著者はA型およびH型特異的レクチンとされるDBAおよびUEA-Iを用いて検索した結果、非癌気管支組織および肺癌組織において宿主の血液型とレクチン結合性に有意な関連性は認められなかった。肺癌組織においてO型症例は全例UEA-I陽性であったが、A型症例でDBA陰性かつUEA-I陽性例を認め、B型、O型症例でDBA陽性例を認めた。各血液型物質の抗原決定基を

認識する特異的モノクローナル抗体を用い、これらの症例に更に詳細な検討を加えることによりA抗原の消失およびH抗原の集積、B型、O型症例におけるA抗原の発現などの血液型物質の異常が明らかとなることが推測される。

肺癌に関する他の研究では、Davidsohnら⁴⁹⁾が肺癌の90%以上に血液型物質が消失することを報告し、Hirohashiら¹⁸⁾は粘液産生型腺癌を対象とし肺腺癌においては正常気管支腺粘液細胞や杯細胞と異なりA, B, H抗原が減少ないし消失し、これらの前駆物質であるI (Ma) 抗原が集積することを証明した。また、小川ら⁴³⁾は同一患者で手術時と剖検時の肺癌組織における血液型物質を比較しH抗原に比べA, B抗原の消失が顕著であることを報告している。また、B型およびO型症例の腫瘍組織にA型物質の発現していることが胃癌⁴⁴⁾、肺腺癌¹⁸⁾で報告されている。このA型活性をもった物質は“A型様抗原”と呼ばれ、oncofetalな腫瘍特異抗原と考えられているForssman抗原やT抗原の前駆物質でありGalNAc残基がserineまたはthreonineと結合したTn抗原などと交叉反応性をもっているとされる⁴⁹⁾⁵⁰⁾。殊にTn抗原は癌化に伴う不完全な糖鎖合成の結果発現し、他のA型活性をもつ抗原に比べてより高率にB型およびO型症例の腫瘍組織に発現していることが証明されている⁵⁰⁾⁵¹⁾。

6) 臨床病態および転移とレクチン結合性

レクチン組織化学の臨床への応用のひとつとしてレクチン結合性と病期や予後との関連性の検討が挙げられる。乳癌^{52)~54)}、膀胱癌⁵⁵⁾⁵⁶⁾等において各種レクチン結合性と臨床病態との関連性を示唆する報告が散見される。

著者は肺癌を対象として日本肺癌学会編「臨床・病理肺癌取り扱い規約」⁵⁷⁾の病期分類に基き局所での進展度を示すT因子別にT_{1, 2}群とT_{3, 4}群とに、またリンパ節転移を表すN因子別にN₀群とN₁₋₃群とに大別し、両群間で各種レクチン結合性を比較したがT_{1, 2}群とT_{3, 4}群およびN₀群とN₁₋₃群のそれぞれの群間においてDBA, UEA-I, RCA-I, PNAの結合性に一部関連する傾向を認めしたが、有意な相関を認めなかった。

転移に関連した細胞間の接着性はシアル酸と密接な関係があるとされる⁵⁸⁾。シアル酸は癌細胞とIV型コラーゲンやフィブロネクチンとの接着性を弱め³¹⁾、培養細胞における接着能を抑制し転移能を促進するとされる⁵⁹⁾。著者はシアル酸とリンパ節転移との関連性をみるためシアル酸の存在によりPNA結合部位が被覆されている表現型PNA⁻, PNA・N(+)⁺の比率をN₀群とN₁₋₃群で比較した結果、N₀群55.0% (11/20)、N₁₋₃群28.6% (11/14)でありN₁₋₃群に高い傾向にあった。

7) 血中CEA値とレクチン結合性

CEAおよびその関連抗原は分子量18-20万の糖タンパクであり糖鎖の組成、とくにシアル酸含量にはかなりの不均一性がみられCEAのもつheterogeneityの主因をなしていると考えられる⁶⁰⁾。腫瘍組織における抗CEA抗体およびレクチンを用いた組織化学的検討からCEAと血液型物質との間には生化学的に類似性のあることが報告されているが⁴⁸⁾⁶¹⁾、血中CEA値とレクチン結合性との関連性についての報告は未だみられない。著者は非小細胞肺癌において血中CEA値と各種レクチン結合性との関連性を検討したが、PNAの陽性率はCEA正常群に比べ高値群で低い傾向にあった。また、シアル酸の存在によりPNA結合部位の被覆されている表現型PNA⁻, PNA・N(+)⁺の比率はCEA正常群に比べ高値群に高い傾向にあり、とくに扁平上皮癌においては有意に高いという新しい知見を得た。このことは腫瘍組織内に含まれるシアル酸と血中へ遊離したCEAとの間に関連性のあることが示唆され興味深い結果であった。

結 語

非癌気管支および各組織型の肺癌組織に対するレクチン結合性を6種のFITC標識レクチン(DBA, UEA-I, RCA-I, WGA, ConA, PNA)を用いた蛍光法により染色し、顕微測光装置にて蛍光強度を測定し客観的評価を行なった。また一部の症例にはビオチン標識レクチンを用いたABC法により組織学的検討を加え、以下の結論を得た。

- 32例の肺癌組織についてビオチン標識レクチン(DBA, UEA-I, PNA・N(+))を用いたABC法により染色を行ない、蛍光法と比較した結果、DBAの陽性率はABC法で低い傾向にあった。
- 健常気管支においてRCA-I, WGA, ConA, PNA・N(+)⁺はすべての構成成分と結合したが、DBA, DBA・N(+), UEA-I, PNAの結合は主として気管支上皮、腺、血管内皮に限局していた。
- 扁平上皮化生をきたした気管支上皮にはPNAを除くすべてのレクチンが結合した。
- 肺癌組織においてUEA-I, RCA-I, WGA, ConA, PNA・N(+)⁺は高い陽性率を示した。扁平上皮癌ではDBAおよびDBA・N(+), PNAの陽性率は43.5% (10/23)、30.4% (7/23)であり他のレクチンに比較して有意に低率であった。腺癌ではPNAの陽性率は57.9% (11/19)でDBAを除いたレクチンに比較して有意に低率であった。小細胞癌ではDBA, DBA・N(+)⁺の陽性率は12.5% (1/8)でPNAを除くレクチンに比較し

て有意に低率であった。DBA に関して腺癌に対する陽性率は他の組織型に比較して有意に高率であった。

5) レクチン結合部位の局在は細胞膜を中心として一部細胞質にもみられた。腺癌の結合部位の局在は扁平上皮癌に比べて多様であった。

6) neuraminidase 処理によるシアル酸除去の結果、DBA の反応性に変化はなかったが PNA の反応性はすべての組織で増強した。

7) 腫瘍分化度に関して UEA-I の結合性は扁平上皮癌において低分化型より中分化型で高い傾向にあり、また DBA の結合性は腺癌において高、低分化型より中分化型で低い傾向にあったが他のレクチンでは有意な差異を認めなかった。

8) 蛍光強度は DBA, DBA・N(+), UEA-I に関しては間質よりも癌胞巣に強かったのに対して WGA, RCA-I, ConA, PNA・N(+), では癌胞巣よりも間質に強かった。

9) ABO 式血液型との関連では各血液型間で DBA および UEA-I の陽性率に有意な関連性を認めなかった。A 型症例で DBA 陰性かつ UEA-I 陽性例を認めたが、O 型症例は全例 UEA-I 陽性であった。また、B 型、O 型症例で DBA 陽性例を認めた。

10) T, N 因子別臨床病期とレクチン結合性に関して DBA, UEA-I, RCA-I, PNA の結合性は一部、関連する傾向を認めたが有意な相関を認めなかった。シアル酸の存在により PNA 結合部位が被覆されている表現型 PNA⁻, PNA・N(+)⁺ の比率は N₀ 群に比較して N₁₋₃ 群に高い傾向にあった。

11) 扁平上皮癌における PNA⁻, PNA・N(+)⁺ の比率は血中 CEA 正常群に比較して高値群で有意に高率であった。

以上より、レクチン組織化学にこれまで用いられたことのない顕微測光装置を導入し蛍光強度を測定することにより、各組織型の肺癌組織に対するレクチン結合性を客観的かつ包括的に評価した結果、肺癌組織にみられる様々な糖鎖構造の異常の解析には DBA, UEA-I, PNA が有用であるという新しい知見を得ることができた。

本論文の要旨は第 29 回日本肺癌学会総会 (1988 年 10 月, 福岡), 第 29 回日本胸部疾患学会総会 (1989 年 4 月, 京都), 第 47 回日本癌学会総会 (1989 年 10 月, 名古屋) および第 52 回日本肺癌学会関西支部会 (1990 年 2 月, 奈良) において発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学第 2 内科学教室成田亘啓教授に深甚なる

謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言を賜りました法医学教室廣田忠臣教授ならびに腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝いたします。さらに直接、御指導、御教示して頂いた第 2 内科学教室米田尚弘助手に感謝します。また、手術摘出材料を御提供して頂いた第 3 外科学教室飯岡壮吾助教授ならびに気管支鏡下生検材料を御提供して頂いた第 2 内科学教室堅田 均講師、腫瘍放射線科学教室今井照彦助手および日々の研究に御援助を頂いた第 2 内科学教室澤木政好講師をはじめ教室員諸兄姉に深謝いたします。

文 献

- 1) N. シャロン著/大沢利昭訳: 複合糖質—構造・合成・機能. 学会出版センター, 東京, p109-155, 1986.
- 2) Damjanov, I.: Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab. Invest. 57: 5-20, 1987.
- 3) Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S., Maruta, 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. J. Natl. Cancer Inst. 71: 9-24, 1983.
- 4) Kellokumpu, I., Karhi, K. and Andersson, L. C.: Lectin-binding site in normal, hyperplastic, adenomatous and carcinomatous human colorectal mucosa. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A. 94: 271-280, 1986.
- 5) Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S., Kuroki, K. and Sato, E.: Lectin histochemistry in a case of ulcerative colitis complicating rectal carcinoma. Acta Pathol. Jpn. 35: 1571-1579, 1985.
- 6) Neathem, A., Dokal, I. and Atkins, N.: Lectin binding to normal and malignant breast tissue. Diagnost. Histopathol. 6: 171-180, 1983.
- 7) Franklin, W. A.: Tissue binding of lectins in disorders of the breast. Cancer 51: 295-300, 1983.
- 8) Ohuchi, N., Nose, M., Abe, R. and Kyogoku, M.: Lecin-binding patterns of breast carcinoma: Significance on structural atypism. Tohoku J. Exp. Med. 143: 491-499, 1984.
- 9) Bychkov, V. and Toto, P. D.: Wheat germ and peanut agglutinin binding to normal, dysplastic and neoplastic cervical epithelium. Gynecol.

- Obstet. Invest. **21**: 158-163, 1986.
- 10) **Söderström, K. O.** : Lectin binding to prostatic adenocarcinoma. *Cancer* **60**: 1823-1831, 1987.
- 11) **Hyum, K. H., Nakai, M., Kawamura, K.** and **Mori, M.** : Histochemical studies of lectin binding patterns in keratinized lesions, including malignancy. *Virchows Archiv. A.* **402**: 337-351, 1984.
- 12) **Ariano, M. C., Wiley, E. L., Ariano, L., Coon, J. S.** and **Tetzlaff, L.** : H, peanut lectin receptor, and carcinoembryonic antigen distribution in keratoacanthomas, squamous dysplasias, and carcinomas of skin. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **11**: 1076-1083, 1985.
- 13) **Cooper, H. S.** : Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry. *Human Pathol.* **15**: 904-906, 1984.
- 14) **Mazzuca, M., Lhermitte, M., Lafitte, J. J.** and **Roussel, P.** : Use of lectins for detection of glycoconjugates in the glandular cells of the human bronchial mucosa. *J. Histochem. Cytochem.* **30**: 956-966, 1982.
- 15) **Inai, K., Kou, E., Nambu, S.** and **Tokuoka, S.** : An altered lectin binding to mucus glycoprotein in goblet cells of human tracheobronchial epithelium among former mustard-gas workers. *Acta Pathol. Jpn.* **37**: 537-548, 1987.
- 16) **Shiba, M., Ohiwa, T.** and **Klein-Szanto, A. J. P.** : Lectin-binding sites in preneoplastic and neoplastic lesions of human and rodent respiratory tracts. *J. Natl. Cancer Inst.* **72**: 43-51, 1984.
- 17) **Kawai, T., Greenberg, S. D., Truohg, L. D., Mattioli, C. A., Klima, M.** and **Titus, J. L.** : Differences in lectin binding of malignant pleural mesothelioma and adenocarcinoma of the lung. *Am. J. Pathol.* **130**: 401-410, 1988.
- 18) **Hirohashi, S., Ino, Y., Kodama, T.** and **Shimosato, Y.** : Distribution of blood group antigens A, B, H, and I (Ma) in mucus-producing adenocarcinoma of human lung. *J. Natl. Cancer Inst.* **72**: 1299-1305, 1984.
- 19) **Raedler, A.** and **Raedler, E.** : The use of lectins to study normal differentiation and malignant transformation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **109**: 245-251, 1985.
- 20) **Yoneda, T., Kohnoike, Y., Katada, H., Sawaki, M.** and **Narita, N.** : A study on lectin-binding to lung cancer : Clinical application for cytological and histological diagnosis of lung cancer. *Jpn. J. Med.* **26**: 492, 1987.
- 21) **Macartney, J. C.** : Fucose-containing antigens in normal and neoplastic human gastric mucosa : A comparative study using lectin histochemistry and blood group immunohistochemistry. *J. Pathol.* **152**: 23-30, 1987.
- 22) **Örntoft, T. F.** : A method for T-antigen demonstration by a polyclonal antibody and *peanut* lectin ; Elimination of cross-reaction with naturally occurring antibodies. *Virchows Archiv. A.* **404**: 159-166, 1984.
- 23) **Leathem, A.** : Lectin histochemistry. *in Immunocytochemistry* (Polak, J. M. and Noorden, S. V., eds.). Wright, Bristol, p 167-187, 1986.
- 24) **川生 明** : 図説 蛍光抗体法—その原理と技術および応用. ソフトサイエンス社, 東京, p 115-118, 1983.
- 25) **Klein, P. J., Osmers, R., Vierbuchen, M., Ortman, M., Kania, J.** and **Uhlenbruck, G.** : The importance of lectin binding sites and carcinoembryonic antigen with regard to normal, hyperplastic, adenomatous, and carcinomatous colonic mucosa. *Recent Results in Cancer Res.* **79**: 1-9, 1981.
- 26) **Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S.** and **Sato, E.** : Glycoconjugate with *Ulex europaeus* agglutinin-I-binding sites in normal mucosa, adenoma, and carcinoma of the human large bowel. *J. Natl. Cancer Inst.* **69**: 777-785, 1982.
- 27) **Ching, C. K., Black, R., Helliwell, T., Savage, A., Barr, H.** and **Rhodes, J. M.** : Use of lectin histochemistry in pancreatic cancer. *J. Clin. Pathol.* **41**: 324-328, 1988.
- 28) **Sato, E., Maruta, K., Yonezawa, S.** and **Nakamura, T.** : Blood group H (O) antigen in normal, dysplastic and carcinomatous esophageal epithelium. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **75**: 223-229, 1984.
- 29) **Gloor, E.** and **Hurlimann, J.** : Cervical intraepithelial glandular neoplasia (adenocarcinoma in

- situ and glandular dysplasia). *Cancer* **58**: 1272-1280, 1986.
- 30) **Lehman, T. P., Cooper, H. S. and Mulholland, S. G.** : Peanut lectin binding sites in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* **53**: 272-277, 1984.
- 31) **Schaumburg-Lever, G., Alroy, J., Ucci, A. and Lever, W. F.** : Cell surface carbohydrates in proliferative epidermal lesions. *J. Cutan. Pathol.* **13**: 163-171, 1986.
- 32) **下里幸雄** : 肺癌 : その組織発生, 分化, 予後因子について. *日病会誌.* **72**: 29-57, 1983.
- 33) **Fujimoto, H., Muramatsu, T., Urushihara, H. and Yanagisawa, K. O.** : Receptors to *Dolichos biflorus* agglutinin. A new cell surface marker common to teratocarcinoma cells and preimplantation mouse embryos. *Differentiation* **22**: 59-61, 1982.
- 34) **Reisner, Y., Gachelin, G., Dubois, P., Nicolas, J. F., Sharon, N. and Jacob, F.** : Interaction of *peanut* agglutinin, a lectin specific for nonreducing terminal D-galactosyl residues, with embryonal carcinoma cells. *Developmental Biology* **61**: 20-27, 1977.
- 35) **Farr, A. G., Anderson, S. K., Braddy, S. C. and Mejino, J. L. V.** : Selective binding of *Dolichos bifloris* agglutinin to L3T4⁺, LYT-2⁻ thymocytes. Expression of terminal α -linked N-acetyl-D-galactosamine residues defines a subpopulation of fetal and adult murine thymocytes. *J. Immunol.* **140**: 1014-1021, 1988.
- 36) **Louis, C. J., Szynda, T., Cheng, Z. M. and Wyllie, R. G.** : Lectin-binding affinities of human breast tumors. *Cancer* **52**: 1244-1250, 1983.
- 37) **Kahn, H. J. and Baumal, R.** : Differences in lectin binding in tissue sections of human and murine malignant tumors and their metastases. *Am. J. Pathol.* **119**: 420-429, 1985.
- 38) **Calafat, J. and Janssen, H.** : Binding of lectins to human mammary tumors. : Ultrastructural study. *Breast Cancer Res. Treat.* **4**: 169-179, 1984.
- 39) **Skerrow, C. J. and Bell, C. M.** : Lectin-binding abnormalities in the stromal and epithelial components of basal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **52**: 117-122, 1985.
- 40) **Hakomori, S. and Young, Jr., W. W.** : Tumor-associated glycolipid antigens and modified blood group antigens. *Scand. J. Immunol.* **7** (suppl.6): 97-117, 1978.
- 41) **Kapadia, A., Feizi, T., Jewell, J., Kelling, J. and Slavin, G.** : Immunocytochemical studies of blood group A, H, I, and i antigens in gastric mucosae of infants with normal gastric histology and of patients with gastric carcinoma and chronic benign peptic ulceration. *J. Clin. Pathol.* **34**: 320-337, 1981.
- 42) **Lee, A. K., Delellis, R. A., Rosen, P. P., Saigo, P. E., Gangi, M. D., Bagin, R., Groshen, S. and Wolfe, H. J.** : ABH blood group isoantigen expression in breast carcinomas. -An immunohistochemical evaluation using monoclonal antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* **83**: 308-319, 1985.
- 43) **小川純一, 岩崎正之, 井上宏司, 小出司郎策, 川田志明, 正津 晃, 長村義之** : 肺癌細胞膜における A, B, H, Lewis^a, CA19-9, CEA 各抗原の変化と予後との相関. *肺癌* **27**: 779-787, 1987.
- 44) **Häkkinen, I.** : A-like blood group antigen in gastric cancer cells of patients on blood groups O or B. *J. Natl. Cancer Inst.* **44**: 1183-1193, 1970.
- 45) **箱守仙一郎** : 癌細胞膜. *代謝* **17**: 1403-1416, 1980.
- 46) **Hakomori, S., Wang, S.-M. and Young, Jr., W. W.** : Isoantigenic expressions of Forssman glycolipid in human gastric and colonic mucosa : Its possible identity with "A-like antigen" in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3023-3027, 1977.
- 47) **Macartney, J. C.** : Lectin histochemistry of galactose and N-acetyl-galactosamine glycoconjugates in normal gastric mucosa and gastric cancer and the relationship with ABO and secretor status. *J. Pathol.* **150**: 135-144, 1986.
- 48) **Schoentag, R., Williams, V. and Kuhns, W.** : The distribution of blood group substance H and CEA in colorectal carcinoma. *Cancer* **53**: 503-509, 1984.
- 49) **Davidsohn, I. and Ni, L. Y.** : Loss of isoantigens A, B, and H in carcinoma of the lung. *Am. J. Pathol.* **57**: 307-334, 1969.
- 50) **Clausen, H. and Hakomori, S.** : ABH and

- related histo-blood group antigens ; Immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox. Sang.* **56**: 1-20, 1989.
- 51) Hirohashi, S., Clausen, H., Yamada, T., Shimosato, Y. and Hakomori, S. : Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC-LU-35 and -81 expressed in cancer of blood group O or B individuals : Its identification as Tn antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7039-7043, 1985.
- 52) Fenlon, S., Ellin, I. O., Bell, J., Todd, J. H., Elston, C. W. and Blamey, R. W. : *Helix pomatia* and *Ulex europaeus* lectin binding in human breast carcinoma. *J. Pathol.* **15**: 169-176, 1987.
- 53) Leathem, A. J. and Brooks, S. A. : Predictive value of lectin binding on breast cancer recurrence and survival. *Lancet* **8541**: 1054-1056, 1987.
- 54) Dansey, D., Murray, J., Ninin, D. and Bezwoda, W. R. : Lectin binding in human breast cancer : Clinical and pathologic correlations with fluorescein-conjugated *peanut, wheat germ* and *concanavalin A* binding. *Oncology* **45**: 300-302, 1988.
- 55) Coon, J. S., Weitein, R. S. and Summers, J. L. : Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **77**: 692-699, 1982.
- 56) 角谷秀典, 佐藤信夫, 井坂茂夫, 島崎 淳, 松寄 理 : 膀胱腫瘍のレクチン結合糖鎖. *泌尿紀要* **34**: 86-89, 1988.
- 57) 日本肺癌学会編 : 臨床・病理肺癌取り扱い規約 (改訂第3版). 金原出版, 東京, 1987.
- 58) 豊島 聰, 大沢利昭 : 細胞膜と転移. *Oncologia* **13**: 13-24, 1985.
- 59) Fogel, M., Altevogt, P. and Shirrmacher, V. : Metastatic potential severely altered by changes in tumor cells adhesiveness and cell surface sialylation. *J. Exp. Med.* **157**: 371-376, 1983.
- 60) 名倉 宏, 堤 寛 : 癌胎児性抗原, carcinoembryonic antigen (CEA) ・病理と臨床 vol. 6 臨時増刊号 ・免疫組織化学. 文光堂, 東京, p109-119, 1988.
- 61) Matsusita, Y., Yonezawa, S., Nakamura, T., Shimizu, S., Ozawa, M., Muramatsu, T. and Sato, E. : Carcinoma-specific *Ulex europaeus* agglutinin-I binding glycoproteins of human colorectal carcinoma and its relation to carcinoembryonic antigen. *J. Natl. Cancer Inst.* **75**: 219-226, 1985.

Explanation of figures

- Fig. 1. Non-cancerous bronchus. (a) FITC-conjugated RCA-I staining was observed in bronchial epithelial cells, basement membrane, and endothelial cells. ($\times 200$) (b) FITC-conjugated UEA-I staining was observed in bronchial epithelial cells and endothelial cells. ($\times 200$)
- Fig. 2. Bronchial epithelium with squamous metaplasia, demonstrating positive FITC-conjugated UEA-I staining in cell membrane. ($\times 300$)
- Fig. 3. Moderately differentiated squamous cell carcinoma, demonstrating positive FITC-conjugated UEA-I staining in cancer cell membrane. ($\times 200$)
- Fig. 4. Moderately differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive FITC-conjugated DBA staining in cancer cells. ($\times 200$)
- Fig. 5. Small cell carcinoma, demonstrating positive FITC-conjugated UEA-I staining in cancer cell membrane. ($\times 100$)
- Fig. 8. (a) Moderately differentiated squamous cell carcinoma, demonstrating positive biotinylated UEA-I staining in cancer cells. ($\times 200$)
(b) Mucus-producing adenocarcinoma, demonstrating positive biotinylated PNA staining with neuraminidase treatment in mucin and cancer cells. ($\times 100$) Nuclear counterstain by hematoxylin.

