

ヒト正常および癌化した肺組織における血液型抗原と ポリ-N-アセチルラクトサミンおよびケラタン硫酸の局在

奈良県立医科大学法医学教室

森村佳史, 羽竹勝彦

LOCALIZATION OF BLOOD GROUP ANTIGEN, POLY-N-ACETYLACTOSAMINE AND KERATAN SULPHATE EPI TOPE IN NORMAL AND MALIGNANT TISSUE OF HUMAN LUNG

YOSHIFUMI MORIMURA and KATSUHIKO HATAKE

Department of Legal Medicine, Nara Medical University

Received October 13, 2000

Abstract: Poly-N-acetyllactosaminyl structures are considered to be patho-physiologically important carbohydrate antigens, and to play important roles in not only cell differentiation, malignant transformation, and cancer metastasis but also blood group ABO antigens. The aim of the present study was to investigate the stainability of human lung cancer tissues by using 6 lectins (PWM, PFA, LEA, STA, DSA, and Suc-WGA) which have specificity for poly-N-acetyl lactosaminyl structures, monoclonal 5-D-4 antibody which strongly reacts with keratan sulfate, and monoclonal anti-A and anti-B antibodies. In normal human lung tissues, alveolar epithelium cells and ciliated cells of bronchiole were positively stained by each lectin. In lung cancer tissues, well and moderately differentiated adenocarcinomas and some well-differentiated squamous cell carcinomas were stained by the lectins in cancer cell membranes and cytoplasm. However, low grade adenocarcinomas, low and moderate grade squamous cell carcinomas, and small and large cell carcinomas were not stained. Neuraminidase enzyme digestion strongly stained normal lung alveolar epithelium cells, but not well-differentiated adenocarcinomas.

5-D-4 antibody stained cell membrane and cytoplasm in some well-differentiated adenocarcinomas. UEA-1 lectin and monoclonal anti-A and anti-B antibodies stained alveolar epithelium cells in normal tissues, cell membrane and cytoplasm in well and moderately differentiated adenocarcinomas, and well and moderately differentiated squamous cell carcinomas.

The stainability was consistent with the ABO blood groups of each individual. From these results, normal lung tissues have poly-N-acetyllactosaminyl structures coated by sialic acid with linear unbranched short and long sequences and highly branched sequences. However, well-differentiated adenocarcinomas and squamous cell carcinomas were considered to have poly-N-acetyllactosaminyl structures not coated by sialic acid. Also, it was suggested that some well-differentiated adenocarcinomas have keratan sulfate epitopes, and that well-differentiated adenocarcinomas and squamous cell carcinomas have blood group antigens. The authors conclude that well-differentiated adenocarcinomas and

squamous cell carcinomas have poly-N-acetylglucosaminyl structures with keratan sulfate epitopes and that the structure is involved in blood group antigens.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 493~507, 2000)

Key words: poly-N-acetylglucosaminyl structure, lung cancer, blood group antigen, keratan sulfate epitope, lectin

緒 言

組織を構成する細胞や細胞間質には様々な複合糖質が存在する¹⁾。複合糖質は糖タンパク, proteoglycan(ムコ多糖)および糖脂質の三者の総称であり, 糖タンパクは細胞膜の主要な要素をなしており, 細胞の分化^{2,3)}, 加齢⁴⁾, 悪性変化⁵⁻⁹⁾ や変性¹⁰⁾ などに際して変化することが知られている。これらの糖タンパクの末端構造を認識するのがレクチンであり, 植物, 動物, 微生物に広く存在し, これまでに多くの種類が発見されており, それぞれのレクチンは特定の糖鎖構造を認識し結合する¹¹⁾。近年, 糖鎖構造の変化をレクチンを用いた組織細胞化学的方法により¹²⁾ 顕微鏡下に観察することが可能となった。このような組織化学的手法を用いて, 悪性腫瘍の診断に応用するために様々なアプローチがなされてきた^{5,6,13,14)}。糖鎖抗原はきわめて多様な構造をもつことができ, その一つはコア構造から分岐する側鎖の数である。一側鎖をもつものから五側鎖をもつものまで知られている。多様性の第二は側鎖の長さであり, 大部分の側鎖はN-アセチルグルコサミンにガラクトースがついてN-アセチラクトサミンを形成し, さらにこれにシアル酸がつき, その側鎖はそれ以上のびることなく終結する。従って, この場合1つの側鎖あたりN-アセチラクトサミンを1つもつ。これに対して, N-アセチラクトサミンを2つ, あるいはそれ以上くりかえしてもつ構造も見られ, このくりかえし構造はポリ-N-アセチラクトサミン(以下P-N-Aと記す)と総称される。多様性の第三は, 側鎖の修飾でP-N-A上のガラクトースで分岐がつくられ, Gal-β1-4GlcNAc β1-6(Gal β1-4GlcNAc β1-3)Galという構造を形成し, この構造は血液型のI抗原の決定基である。一方, 分岐していない直鎖型のP-N-A, Gal-β1-4GlcNAc β1-3 Gal β1-4GlcNAc β1はi抗原を担っている。すなわちi抗原は直鎖型のN-アセチラクトサミンを2つもつ構造であり, I抗原はそれが分岐した構造をもつ。P-N-Aのくりかえし構造をもたないN-アセチラクトサミンに比べて, さまざまな糖転移酵素により修飾される場合が多くみられることから細胞の分化, 発生や癌化に特異的な糖鎖構造を示すことが多く, 生物

学的あるいは病理学的に重要な働きをしていると考えられている¹⁵⁾。このI/I式血液型抗原は分化抗原の一つでありi抗原からα-1, 2-フコース転移酵素系でH型物質を形成しABO式血液型抗原をつくる。このようにP-N-Aは細胞の分化, 癌化, 癌細胞の転移に関与するだけでなく血液型抗原と関連している。肝細胞癌や結腸癌¹⁶⁾, 胃癌^{17,18)} において線状や分岐したP-N-Aの構造が示唆されているが, 呼吸器系に関するレクチン結合性の検討は少なく, また使用されたレクチンはガラクトースやN-アセチラクトサミンの単糖に特異性のあるムチン型糖鎖に対する研究が主であり, P-N-Aについてのレクチンの結合性について検討を加えた報告はきわめて少ない。今回P-N-Aに特異的に反応するレクチンを用いた種々のタイプのヒト肺癌組織においてP-N-Aの合成能および血液型関連抗原の発現の有無を中心に検討を行った。

対 象

対象は当法医学教室で剖検された未呼吸生産児を含むヒト正常組織21例(0歳~78歳, 男性14例, 女性7例)をホルマリン固定しパラフィン切片とした。また本学第1病理学教室にて剖検時採取された肺癌組織24例(腺癌10例, 扁平上皮癌9例, 小細胞癌3例, 大細胞癌2例, 39~79歳, 男性18例, 女性6例)のパラフィンブロックをパラフィン切片とした。

方 法

用いたレクチンと抗体は以下に示す通りである。用いたレクチンの濃度と糖鎖特異性はTable 1に示している。すなわち, DSA(datura stramonium agglutinin)は1, 2個のラクトサミンの繰り返し構造の短鎖のP-N-Aに¹⁹⁾, LEA(lycopersicon esculentum agglutinin)は3個またはそれ以上の繰り返し構造の長鎖のP-N-Aに²⁰⁻²²⁾, PWM(pokeweed mitogen)は高度分岐したP-N-Aに特異性がある²³⁻²⁵⁾。PFA(phalera flavescens agglutinin)²⁶⁾, STA(solanum tuberosum agglutinin)²⁷⁾, Suc-WGA(succinyl wheat germ agglutinin)²⁸⁾ に関してはP-N-Aに対する親和性は高いものの構造特異性はよくわかっていない。また5-D-4

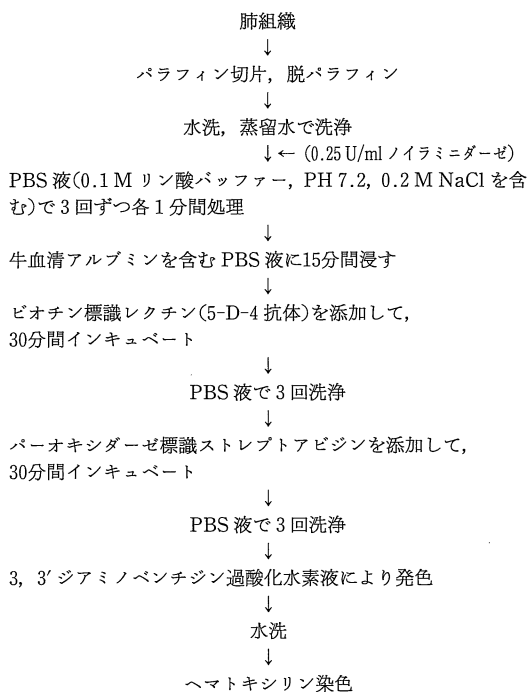


Fig. 1. Staining method by biotin labelled lectin and 5-D-4 antibody

Table 1. Concentration and carbohydrate specificity of 6 lectins

lectins	concentration	specificity
		(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)
		(1-2)
DSA	40 μ g/ml	β 1 6 Man 2
		Gal β 1-4GlcNAc β 1
LEA	50 μ g/ml	(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3) (n \geq 3)
PWM	30 μ g/ml	$\left[\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-3 \\ 6 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1 \end{array} \right]_n$
PFA	20 μ g/ml	NI
STA	20 μ g/ml	NI
Suc-WGA	20 μ g/ml	NI

Gal=D-galactose ; GlcNAc=N-acetyl-D-glucosamine
Man=D-mannose ; NI=not identified.

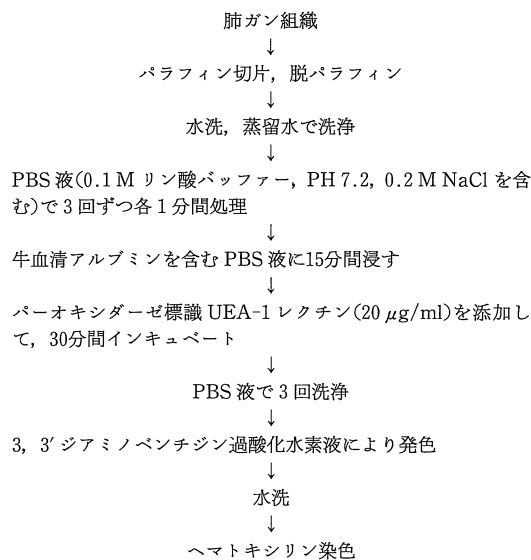


Fig. 2. Staining method by UEA-1 lectin

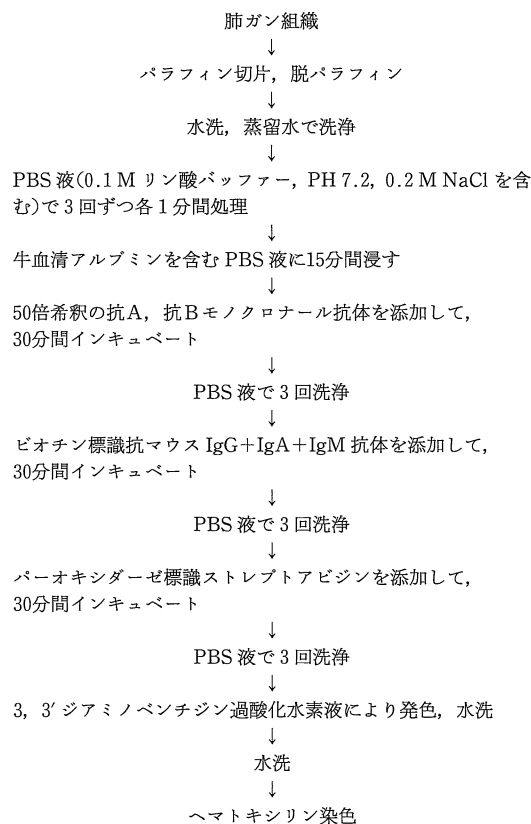


Fig. 3. Staining method by monoclonal anti A and anti B bodies

抗体, モノクローナル抗A, 抗B抗体, O型に対して UEA-1(ulex europaeus agglutinin-1)を用いた. Fig. 1には各種レクチンと5-D-4抗体による染色方法を示している. すなわち脱パラフィン後, 水洗, 蒸留水で洗浄し, PBS(0.1 M リン酸バッファー, pH 7.2, 0.2 M NaClを含む)液で, 3回ずつ各1分間処理した. その後, 牛血清アルブミン(1 mg/ml)を含む PBS 液で15分間浸し, 希釈したレクチンを添加し30分間インキュベートした. 各レクチン液でインキュベート後 PBS 液で3回洗浄し, パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを添加して, 30分間インキュベートした. PBS 液で3回洗浄した後, 3,3'-ジアミノベンチジン過酸化水素液によりレクチン反応部位の発色を行った. 水洗後, ヘマトキシリンによる核染色を行った. ノイラミナーゼ酵素処理は脱パラフィン後, 水洗, 蒸留水で洗浄した切片に0.1 M アセター

トバッファー, pH 5.0で希釈した濃度0.25 U/mlのノイラミナーゼを添加し, 37°Cの恒温槽に20時間インキュベートすることによって行った. UEA-1による染色方法はFig. 1に示したレクチンと100倍希釈の5-D-4抗体による染色方法とほぼ同様であるが, Fig. 2に示すようにビオチン標識レクチンの代わりにパーオキシダーゼ標識 UEA-1レクチンを添加して発色させヘマトキシリン染色を行った. またモノクローナル抗A, 抗B抗体による染色方法はFig. 3に示すようにビオチン標識レクチンの代わりに50倍希釈の抗A, 抗B抗体を添加してパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンの前にビオチン標識抗マウス IgG+IgA+IgM 抗体を添加して発色させ染色を行った.

ビオチン標識されたレクチン DSA, LEA, STA, Suc-WGA, PWM は EY 社製あるいは Sigma 社製のもの

Table 2. Age and stainability of 6 lectins in normal lung tissues

case	age	location	DSA	LEA	PWM	PFA	STA	Suc-WGA
1	生後1日	肺胞上皮	+	+	+	+	-	+
		細気管支	-	-	+	+	-	-
2	1カ月	肺胞上皮	+	+	+	+	+	+
		細気管支	+	+	+	+	+	+
3	7カ月	肺胞上皮	-	+	+	+	-	+
		細気管支	-	+	+	+	-	+
4	16才	肺胞上皮	+	+	+	+	+	+
		細気管支	+	+	+	+	+	+
5	18才	肺胞上皮	+	+	+	+	+	+
6	22才	肺胞上皮	+	+	+	+	+	+
		細気管支	+	+	+	+	+	+
7	22才	肺胞上皮	-	+	+	+	-	-
8	26才	肺胞上皮	+	+	+	+	+	+
		細気管支	+	+	+	+	+	+
9	36才	肺胞上皮	+	+	+	+	+	+
		細気管支	+	+	+	+	+	-
10	37才	肺胞上皮	+	-	+	+	-	+
11	40才	肺胞上皮	+	+	+	+	-	+
12	47才	肺胞上皮	+	+	+	+	-	+
13	56才	肺胞上皮	+	-	+	+	+	+
		細気管支	+	-	+	+	-	+
14	56才	肺胞上皮	+	+	+	+	+	+
15	57才	肺胞上皮	+	+	+	+	+	+
		細気管支	+	+	+	+	+	+
16	60才	肺胞上皮	+	+	+	+	+	+
		細気管支	+	+	+	+	+	+
17	64才	肺胞上皮	-	-	+	+	-	-
18	70才	肺胞上皮	+	+	+	+	-	-
19	71才	肺胞上皮	-	+	+	+	-	+
20	73才	肺胞上皮	+	+	+	+	-	+
		細気管支	+	+	+	+	-	+
21	78才	肺胞上皮	+	+	+	+	-	-

+ : positively stained

- : negatively stained

を用いた。PFA は山形大学医学部法医学教室梅津和夫助教授より提供していただき、Biotinylation kit(Amersham 社製)によりビオチン化した。ノイラミダーゼは丸金醤油社製、5-D-4 抗体は生化学工業社製、モノクロナール抗A, 抗B抗体はBio Carb chemicals 社製、UEA-1 はEY 社製、ビオチン標識抗マウス IgG+IgA+IgM 抗体およびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンはニチレイ社製の Histofine SAB-PO(M)Kit を用いた。

結 果

A) ヒト正常肺組織について

Table 2 に正常肺組織 21 例における 6 種類のレクチンによる染色についての結果を示した。一部の症例において染色されないレクチンがみられたが、大部分の症例において 6 種類のレクチンいずれも細気管支線毛細胞から肺胞上皮細胞にいたる全ての細胞が染色された。細気管支線毛細胞では線毛部分が、肺胞上皮細胞では細胞膜

部分が染色された。染色の程度についてはレクチンの中では PFA が最も染色性が強く、次いで PWM が強かった。Suc-WGA, DSA では中等度の染色性を示し、LEA および STA では染色性が弱く、また染色されない場合もあった。未呼吸生産児(Plate 1)と生後約 1 ヶ月を含む(Plate 2)全ての年齢の肺組織において同様の染色性が見られた。ノイラミダーゼを用いて染色した場合、用いない場合と比べて PWM 以外の 5 種類のレクチン全てにおいて濃染された。また抗A, 抗B抗体, UEA-1 による染色は正常肺胞上皮細胞, 粘液腺細胞や血管の内皮細胞が染色された。染色から判定される血液型は個人の血液型と一致していた。

B) ヒト肺癌組織について

1) 6 種類のレクチンおよび 5-D-4 抗体による染色性について

Table 3 に肺癌組織 24 例(腺癌 10 例, 扁平上皮癌 9

Table 3. Stainability of 6 lectins and 5-D-4 antibody in human lung cancer tissues

case	age	組織	DSA	LEA	PWM	PFA	STA	Suc-WGA	5-D-4
腺癌									
1	69	高分化型	+	+	+	+	-	+	+
2	72	高分化型	+	+	+	+	+	+	+
3	78	高分化型	+	-	+	+	-	+	+
4	62	中分化型	-	-	+	+	-	+	-
5	63	中分化型	-	-	+	+	+	-	-
6	65	中分化型	-	-	-	-	-	-	-
7	65	中分化型	-	+	-	+	+	+	+
8	51	低分化型	-	-	-	-	-	-	-
9	54	低分化型	-	-	-	-	-	-	-
10	57	低分化型	-	-	-	-	-	-	-
扁平上皮癌									
1	57	高分化型	-	-	-	-	-	-	-
2	70	高分化型	-	-	-	+	-	+	-
3	67	中分化型	-	-	-	-	-	-	-
4	72	中分化型	-	-	-	-	-	-	-
5	75	中分化型	-	-	-	-	-	-	-
6	39	低分化型	-	-	-	-	-	-	-
7	49	低分化型	-	-	-	-	-	-	-
8	69	低分化型	-	-	-	-	-	-	-
9	79	低分化型	-	-	-	-	-	-	-
小細胞癌									
1	70		-	-	-	-	-	-	-
2	71		-	-	-	-	-	-	-
3	75		-	-	-	-	-	-	-
大細胞癌									
1	51		-	-	-	-	-	-	-
2	66		-	-	-	-	-	-	-

+ : positively stained

- : negatively stained

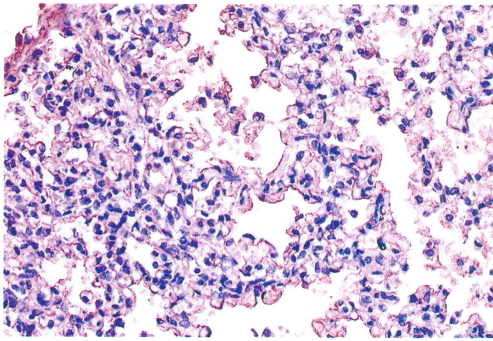


Plate. 1. Live-born infant without respiring. Alveolar epithelium cells are positively stained by PFA.

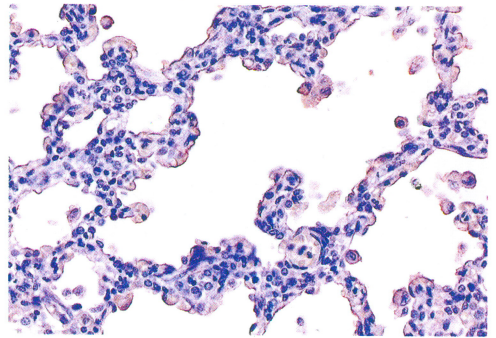


Plate. 2. Infant (about 1 month). Alveolar epithelium cells are positively stained by PFA.

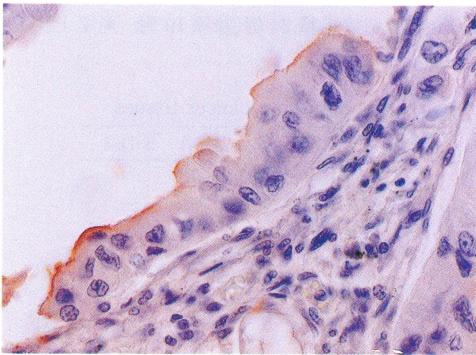


Plate. 3. Section of well differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive PWM staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

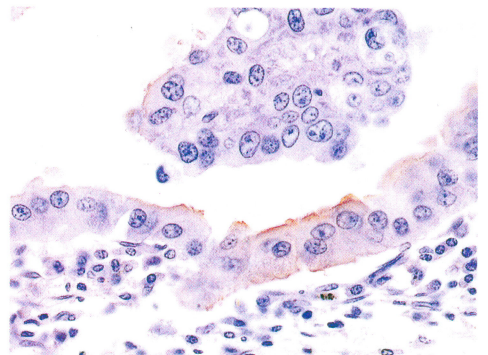


Plate. 4. Section of well differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive Suc-WGA staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

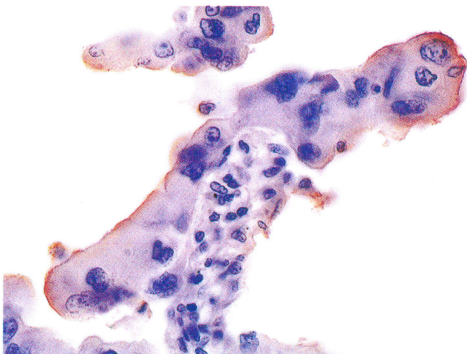


Plate. 5. Section of well differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive PFA staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

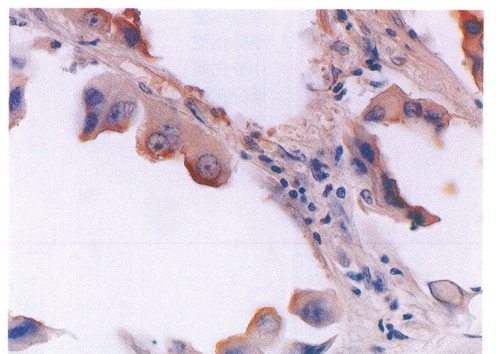


Plate. 6. Section of well differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive PWM staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

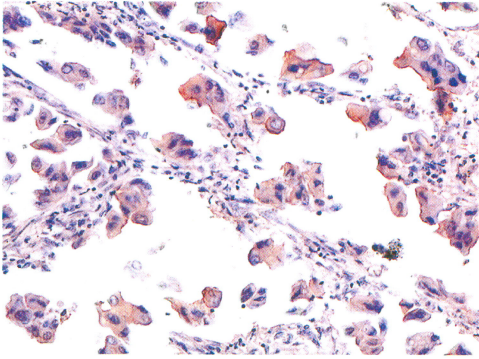


Plate. 7. Section of well differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive PFA staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

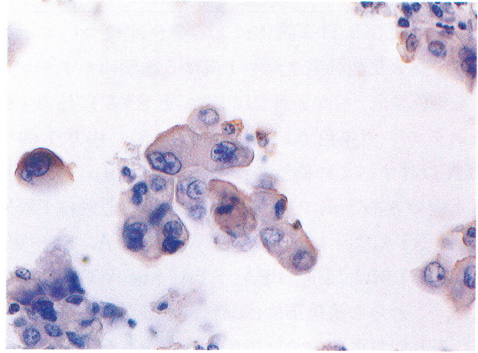


Plate. 8. Section of well differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive Suc-WGA staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

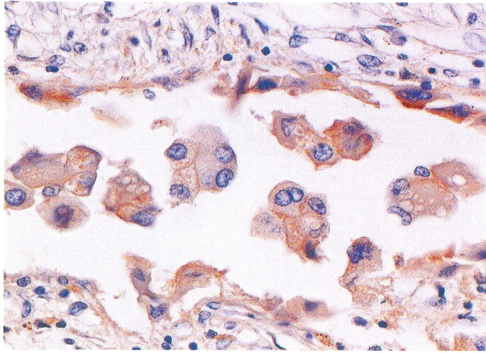


Plate. 9. Section of well differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive DSA staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

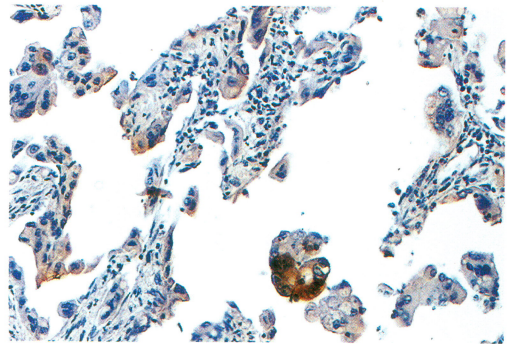


Plate. 10. Section of well differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive monoclonal 5-D-4 antibody staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

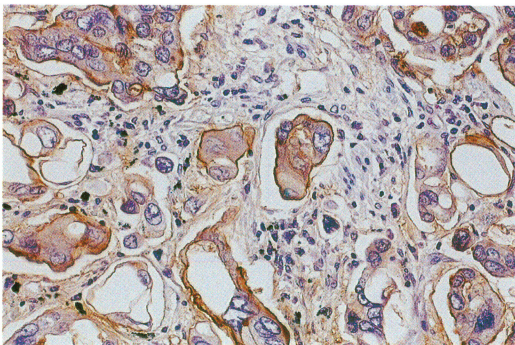


Plate. 11. Section of well differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive UEA-1 staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

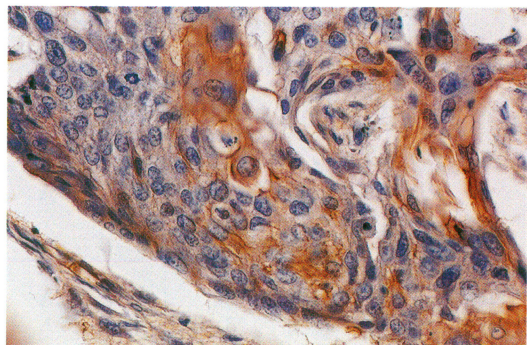


Plate. 12. Section of well differentiated squamous cell carcinoma, demonstrating positive monoclonal anti-A antibody staining in cancer cell membrane and cytoplasm.

例, 小細胞癌 3 例, 大細胞癌 2 例) についての 6 種類のレクチンおよび 5-D-4 抗体による染色性について示している。高分化型腺癌 3 例中 1 例は 6 種類のレクチンいずれも染色され, もう 1 例では LEA と STA 以外の 4 種類のレクチンで染色された (Plate 3~5)。残り 1 例では STA 以外すべてに染色された (Plate 6~9)。中分化型腺癌 4 例のうち 3 例で染色性がみられ, 1 例は PWM, PFA, STA に, もう 1 例は PWM, PFA, Suc-WGA に, 残り 1 例は LEA, PFA, STA, Suc-WGA に染色された。これらの染色部位は細胞膜と細胞質に認められたが, それ以外の部位では染色されなかった。最後の 1 例ではどのレクチンによっても染色されなかった。これに対して低分化型腺癌 3 例では 6 種類のレクチンいずれも染色されなかった。扁平上皮癌では高分化型 2 例中 1 例は PFA と Suc-WGA の 2 種類に染色された。染色部位は細胞膜と細胞質に認められたが, それ以外の部位では

染色されなかった。もう 1 例は 6 種類のレクチンいずれも染色されなかった。中分化型 3 例および低分化型 4 例では 6 種類のレクチンいずれも染色されなかった。小細胞癌および大細胞癌では 6 種類のレクチンとも染色されなかった。5-D-4 抗体では腺癌において高分化型 3 例中 3 例 (1 例を Plate 10 に示す), 中分化型では 4 例中 1 例においてのみ染色された。これらの染色部位は細胞膜と細胞質に認められたが, それ以外の部位では染色されなかった。低分化型腺癌, 扁平上皮癌, 小細胞癌および大細胞癌では染色されなかった。高分化型腺癌についてノイラミダーゼ処理後染色した場合, 染色性は変わらなかった。

2) 抗 A, 抗 B モノクローナル抗体と UEA-1 レクチンによる染色について

Table 4 には肺癌患者の血液型を示している。腺癌に

Table 4. Stainability of monoclonal anti A and anti B bodies and UEA-1 lectin in human lung cancer tissues

case	age	組織型	血液型	抗 A 抗体	抗 B 抗体	UEA-1
腺癌						
1	69	高分化型	A	+	-	-
2	72	高分化型	O	-	-	+
3	78	高分化型	B	-	+	-
4	62	中分化型	O	-	-	-
5	63	中分化型	B	-	+	+
6	65	中分化型	A	-	-	-
7	65	中分化型	O	-	-	+
8	51	低分化型	A	-	-	-
9	54	低分化型	O	-	-	-
10	57	低分化型	A	-	-	-
扁平上皮癌						
1	57	高分化型	A	+	-	-
2	70	高分化型	A	+	-	+
3	67	中分化型	O	-	-	-
4	72	中分化型	A B	+	+	-
5	75	中分化型	A	+	-	-
6	39	低分化型	A	-	-	-
7	49	低分化型	O	-	-	-
8	69	低分化型	A	-	-	-
9	79	低分化型	A	-	-	-
小細胞癌						
1	70		B	-	-	-
2	71		A	-	-	-
3	75		A	-	-	-
大細胞癌						
1	51		O	-	-	-
2	66		A	-	-	-

+ : positively stained - : negatively stained

おいては10例中5例(高分化型3例中3例, 中分化型4例中2例)が染色され、いずれも個人の血液型と一致したが、残りの5例(中分化型4例中2例と低分化型3例)では染色されなかった。Plate 11には高分化型腺癌におけるUEA-1レクチンによる癌細胞の細胞膜および細胞質の染色性を示している。この患者の血液型はO型であり、抗A、抗Bモノクローナル抗体には染色されず染色結果と一致していた。扁平上皮癌では9例中4例(高分化型2例中2例, 中分化型3例中2例)が染色され、いずれも個人の血液型と一致した染色性を示したが中分化型1例と低分化型4例すべては染色されなかった。

Plate 12には血液型A型の扁平上皮癌の高分化型の例を示している。この例では抗Aモノクローナル抗体とUEA-1レクチンにより細胞膜および細胞質に強い染色性が認められたが、抗Bモノクローナル抗体では染色されず血液型と一致した染色性を示した。また小細胞癌、大細胞癌は抗A、抗BおよびUEA-1レクチンいずれも染色されなかった。

考 察

SSEA抗原はSolterとKnowls²⁹⁾によりマウスの着床前の初期胚に発見された抗原であり、胚発生の一定の時期に特異的に出現するためstage-specific embryonic antigen-1となづけられた。SSEA-1抗原は糖鎖抗原であり、SSEA-1抗原はi抗原に1-3結合でフコースが転移したN-アセチルラクトサミンである。フコシルSSEA-1抗原やシアリルSSEA-1抗原のようなSSEA-1系統の抗原は肺の器官形成の未熟な時期には出現するが、分化成熟した細胞にはこれと入れかわるようI系統の抗原が出現する。すなわちI/i抗原は分化抗原の1つであり成長に従ってi抗原(ヒト胎児抗原)はI抗原(成人抗原)へ変換する。本研究にてヒト正常肺組織において、6種類のレクチン染色の結果、肺上皮細胞、細気管支線毛細胞がよく染色された。特にi抗原をよく染めるDSAを除いて5つのレクチンはI抗原とよく反応することから、これらの細胞には複数の側鎖をもつ分岐したP-N-Aが存在していることが示唆され、I抗原の存在が確認された。また特に高度に分岐した糖鎖を認識するPWMに強く染まったもののDSAにも中等度の染色性が認められたことから直鎖状短鎖のP-N-Aつまりi抗原の存在が示唆された。従って、正常細胞には特異性の異なった種々のレクチンに対して染色性を認めたことから細胞表面の糖鎖構造は予想されたよりも不均一性が強く複雑な構造であることが推測された。肺癌の分化度と染色性については近年、癌細胞の分化度の指標とし

てレクチン染色が有用であり、口腔扁平上皮癌ではPNA(Peanut agglutinin), RCA-1(Ricinus Communis agglutinin), DBA(Dolichos Biflorus agglutinin), SBA(Soybean agglutinin), LPA(Limulus Polyphemus agglutinin)において³⁰⁾、腎癌³¹⁾、鼻副鼻腔扁平上皮癌ではWGA, UEA-1, PNA, RCAに対して³²⁾、甲状腺癌³³⁾や喉頭癌³⁴⁾ではPNAに対して陽性反応を示し、分化度の高いもので染色率がよく、分化度の低いものでその率が低いことが報告されている。また肺癌³⁵⁾でも同様の所見が得られているが、これらの研究はいずれも本研究と異なり主にガラクトースやN-アセチルガラクトサミンを染色するPNA, RCA-1, DBA, SBA, LPAが使用されている。本研究でもヒト肺がん組織において、高分化型ならびに中分化型腺癌には6種類のレクチンに染色性の差はあるものの陽性を示した。扁平上皮癌では高分化型のみがPFAとSuc-WGAの2つにおいて陽性を示した。中分化型および低分化型扁平上皮癌、低分化型腺癌、小細胞癌、大細胞癌では6種類全てのレクチンに染色されなかった。つまり分化度によって染色性が異なり、この結果によりP-N-Aは高分化型腺癌と中分化型腺癌と一部の高分化型扁平上皮癌など分化度の高い肺癌に特異的に存在していると考えられ、細胞分化に関連して肺癌においても分化度の上昇とともにレクチンとの結合性が上昇することを示している。細胞の癌化には三側鎖や四側鎖のような高分岐化や糖質の増加がおこっており正常に比して糖合成能が活発であると考えられている³⁶⁾。いずれにしろ、高分化型肺癌では正常組織でも認められるようにP-N-A構造の存在が確認された。一方、低分化型の腺癌や低分化型の扁平上皮癌では、いずれのレクチンでも染色されなかった。

P-N-Aの生合成される場所がトランスゴルジであり、ゴルジ装置を通過する過程において、P-N-Aが合成されるのにはガラクトースとN-アセチルグルコサミンが交互に転移され、さらにシアル酸などの転移によって延長が終結しないことが必要となる。P-N-Aを生合成するための糖転移酵素、 β -ガラクトース転移酵素と β -1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が必要であることから、これら低分化型の癌ではP-N-Aの生合成が十分に稼働していないのかもしれない。一般に細胞の悪性化に伴う糖鎖の変化として2つの様式が考えられる。その1つは正常糖鎖抗原合成経路が障害されていて、中間産物にあたる糖鎖抗原が異常に大量蓄積する糖鎖不全現象とも呼ばれる様式であり、もう一つは異常糖鎖の新規合成が行われて、正常細胞では合成されていない新しい糖鎖抗原が発現する様式である^{37,38)}。従って、特に低分化

型、小細胞癌および大細胞癌では糖鎖不全現象や異常糖鎖の新規合成が活発で正常な P-N-A が合成されず各種レクチンに染色しなかったものと考えられる。

ノイラミナーゼ酵素処理について

糖タンパク質糖鎖に見いだされる大部分の側鎖は、N-アセチルラクトサミンにシアル酸転移酵素によりシアル酸がつき、シアル酸がつくとその側鎖はそれ以上のびることなく終結する。ノイラミナーゼはシアル酸残基を除去する作用をもっている。本研究において正常肺胞上皮組織の染色性について PFA, LEA, STA, DSA, Suc-WGA の 5 つのレクチンはノイラミナーゼにより濃染された。それに対して高分化型腺癌においてノイラミナーゼ処理により各種レクチンの染色性は増加しなかった。この結果はノイラミナーゼ処理により PNA (Peanut agglutinin) は肺正常組織ではその結合部位が増強したが、肺癌組織では増強しなかったという報告³⁹⁾と一致している。この結果は正常組織ではシアル酸によりそれぞれのレクチンの結合部位が被覆されており、これら各種レクチンの結合性抗原の末端近くにシアル酸が結合している形で存在しているので、これらレクチンの結合を阻止しているものと考えられ、ノイラミナーゼ酵素処理によりシアル酸が除去されたため、結合性が上昇し、レクチンの染色性が増加したと考えられる。一方、高分化型腺癌において各種レクチン結合部位はシアル酸に被覆されず露出しており、そのためにノイラミナーゼ処理により影響をうけなかったものと考えられる。この不完全な糖鎖合成について一つは癌化の過程ですでに糖鎖末端のシアル酸が切断除去(アシアロ化)されていることが考えられる。事実肝癌などでは血清中のアシアロ糖タンパク質量が健常人に比べ著しく増大していることが知られている⁴⁰⁾。2つ目は正常な細胞膜と異なって P-N-A 構造が生成される過程で糖鎖末端にシアル酸が付加されず、そのため側鎖が終結せず複雑な糖鎖構造をもっているのかもしれない。3つ目はノイラミナーゼ酵素が作用できない程高度に分岐化しているのかも知れない。しかし、Yogeeswaran ら⁴¹⁾は癌細胞表面のシアル酸は転移能に必要な役割を果たしていることを報告している。また阪本ら⁴²⁾はマウス LLC を用いて移植部と肺転移部腫瘍のレクチン結合性の差異を検討し、転移部腫瘍細胞の細胞膜には移植部に比べシアル酸がより多く含まれていることを示し、Reading ら⁴³⁾は RAW117 リンパ腫瘍細胞を用いた研究で WGA 結合タンパクあるいはシアル酸タンパクの増加が転移性を増大することを報告している。これらのことを考慮すると肺癌ではその糖鎖抗原

にシアル酸がないのではなく、高度に分岐化し複雑な構造をとっているためにノイラミナーゼがシアル残基にまで到達できないのかもしれない。以前から腺癌は肺胞上皮細胞や粘液腺細胞由来、扁平上皮癌は主気管支上皮細胞由来、小細胞癌は APUD 細胞由来、大細胞癌は気管支上皮細胞由来と考えられていた⁴⁴⁾。しかし、最近では腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌も同様に気管支、肺胞に存在する内胚葉性の未分化な上皮細胞由来であって、それが癌化後に気管支、肺胞に存在する各種の上皮細胞へと様々な程度に分化するとの考えがある⁴⁵⁾が、本研究において、レクチンによる染色性から発生母細胞の判定は困難であると考えられた。

ABO 式血液型抗原について

ABO 式血液型抗原は P-N-A によっても担われていることがすでに知られている^{46,47)}。正常組織において ABO 式血液型抗原は肺胞上皮細胞、粘液腺細胞や血管の内皮細胞に発現していた。腫瘍関連抗原と ABH 血液型抗原との間に多くの構造的関連が認められることから、近年ヒト癌組織における ABH 血液型抗原の変化が広く検索されている。多くの組織の細胞表面において ABH 血液型と一致する血液型抗原が発現されるはずであるが、実際には癌組織における発現に変化が生じる。たとえば胃癌⁴⁸⁾において癌化とともに ABH 血液型物質が消失することが明らかになっている。さらに膀胱癌⁴⁹⁾、大腸癌⁵⁰⁾において長期生存が得られた症例では ABH 血液型抗原の検出される頻度が高く、逆に早期死亡例では大部分において ABH 血液型抗原が陰性であったと言われる。肺癌においても細胞膜糖鎖抗原として代表的な血液型物質が消失することは Davidsohn ら⁵¹⁾により報告されている。Davidsohn は種々の臓器の原発性および転移性の腺癌を検索して、血液型物質の消失と癌組織の分化の程度の間に関連を認めたとしている。また肺癌において ABH 血液型抗原の消退が予後不良の重要な因子であり、癌巢の染色性と血液型が一致している群は不一致、陰性群に比べて有意に良好な予後を示す報告がある⁵²⁾。

モノクローナル抗 A, 抗 B 抗体および O 型に染まる UEA-1 を使った本研究においても高分化型ならびに中分化型腺癌、高分化型ならびに中分化型扁平上皮癌には患者の血液型と一致した血液型抗原に対して強い染色性が見られ、これら高分化型の肺癌には血液型抗原が発現していることが証明された。本研究においても低分化型腺癌、低分化型扁平上皮癌、大細胞癌および小細胞癌では染色性が認められず、血液型は判定できなかった。これは ABO 抗原決定基の消失が考えられ、この理由とし

て glycosyltransferase の活性の欠損や不足が起こり血液型物質の合成がされない可能性、2番目に他の糖が付加することによる抗原の masking が起こっている可能性、第3に glycosidase により抗原決定基である炭水化物残基が除去される可能性がある⁵³⁾。また血液型の発現は分化度が高いほど個人の血液型と一致していた。この結果は大腸癌の分化が低い程血液型物質の消失が起こりやすいという松尾らの報告⁵⁴⁾と一致している。いずれにせよ分化度の高い肺癌は ABO 式血液型抗原をになつた P-N-A の存在が示された。

ケラタン硫酸について

ケラタン硫酸はグリコアミノグリカンに属するが、それはケラタン硫酸は GlcNAc の 6 位と Gal の 6 位が硫酸化されており、P-N-A が硫酸化されたものと考えられることができる。ケラタン硫酸に対するモノクローナル抗体を使った最近の研究はケラタン硫酸は角膜や軟骨以外では、ケラチノサイト⁵⁵⁾、気道分泌液のようなムチン^{56,57)}、顆粒細胞腫の腫瘍細胞と子宮内膜の腺上皮⁵⁸⁾など多くの異なった組織に分布していることが知られており、また細胞間認識^{59,60)}や分化、成熟⁶¹⁾に関連している。5-D-4 抗体は硫酸化された P-N-A と強く反応する⁶²⁾。本研究において 5-D-4 抗体を用いて染色した結果、正常肺胞上皮、細気管支線毛上皮に染色性がみられた。正常の甲状腺において ABO 式血液型抗原は血管の内皮細胞以外には染色されないが、特に乳頭状腺癌において高頻度に ABO 式血液型抗原が出現し⁶³⁾、この血液型抗原は線状や分岐状 P-N-A と関連していることが知られている⁶⁴⁻⁶⁷⁾。さらに乳頭状腺癌においてケラタン硫酸 epitope は ABO 式血液型抗原と同時に発現することが報告されている⁶⁸⁾。肺癌においては高分化型腺癌に 5-D-4 抗体の染色性がみられ、従って P-N-A の硫酸化された構造であるケラタン硫酸は高分化型腺癌において合成されていると考えられる。以上の結果を総合的に判断すると高度に分化した肺癌特に腺癌において 6 種類のレクチン、5-D-4 抗体、および ABH 抗原は細胞質および細胞膜において染色された。このことは硫酸化した P-N-A と血液型が関連して発現していると考えられた。

結 語

P-N-A に対して特異的に染色性をもつ各種レクチンを使用し、ヒト正常肺組織 21 例およびヒト肺癌組織 24 例を用い、その染色性について検討した。

1. ヒト正常肺組織において肺胞上皮、細気管支線毛上皮には直線上の長鎖や短鎖の P-N-A や高度に分岐した

P-N-A が存在し、不均一性が強く複雑な構造であることが推測された。

2. ヒト肺癌組織において高分化型ならびに中分化型腺癌、高分化型扁平上皮癌の一部の細胞膜、細胞質に P-N-A が存在し、低分化型腺癌や中分化型および低分化型扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌には P-N-A の存在が確認されなかった。

3. レクチンによる染色性から発生母細胞の判定も困難であると考えられた。

4. P-N-A が硫酸化された構造であるケラタン硫酸は高分化型腺癌、中分化型腺癌の細胞膜と細胞質においてのみ合成されていると考えられた。

5. ノイラミニダーゼ酵素処理により正常肺胞上皮組織は濃染されたが、肺癌組織は濃染されなかったことから、正常肺胞上皮組織は P-N-A 末端にシアル酸が被覆されているが、癌組織においてシアル酸が付加されていない可能性が考えられた。

6. 血液型抗原は正常肺胞上皮細胞、粘液腺細胞や血管の内皮細胞に発現されているのが確認され、また高分化型肺癌において細胞膜と細胞質に発現していたが低分化型肺癌には発現していなかった。

7. 以上から高分化型腺癌では正常組織と同様に P-N-A が存在し、硫酸化した P-N-A と ABO 式血液型抗原との関連が示唆された。

低分化型腺癌や扁平上皮癌、大細胞癌および小細胞癌には P-N-A やケラタン硫酸を識別するレクチンには染色性を示さず、異常な構造の P-N-A の存在が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました故伊藤信助教授に深く感謝致します。また肺癌のパラフィンブロックを提供していただきました第 1 病理学教室市島國雄教授と第 2 内科学教室成田亘啓教授ならびに PFA レクチンを提供していただきました山形大学医学部法医学教室梅津和夫教授に深謝致します。御校閲を賜りました兵庫医科大学病院病理部窪田彬教授に深謝致します。

文 献

- 1) 平野寛：細胞表面の糖鎖と細胞認識。代謝 14：1713-1754, 1977.
- 2) Tanaka, K. and Hirano, H.: Changes in soybean agglutinin (SBA) and peanut agglutinin (PNA) binding pattern in the epidermis of the developing chick embryo. Dev. Growth. and Differ. 25：29-30, 1983.

- 3) **Kawai, N., Nishimura, F. & Hirano, H.** : Changes of lectin binding sites on the embryonic muscle cell surface in the developing ascidian, *Holocynthia aurantium*. *Exp. Cell Res.* **122** : 293-304, 1979.
- 4) **Aubery, M., Guillouzo, A., Bernard, B. and Font, J.** : Changes in *Ricinus communis* lectin binding to the cell surface of human liver cells in culture. The relationship between in vitro cellular aging and the age of the donor. *Exp. Cell Res.* **129** : 273-280, 1980.
- 5) **Sato, E., Maruta, K., Yonezawa, S. and Nakamura, T.** : Blood group H (O) antigen in normal, dysplastic and carcinomatous esophageal epithelium. *Gann* **75** : 223-229, 1984.
- 6) **Ookusa, Y., Takata, K., Nagashima, M. and 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.
- 7) **Martin, Bur. and Franklin, W. A.** : Lectin binding to human gastric adenocarcinomas and adjacent tissues. *Am. J. Pathol.* **119** : 279-287, 1985.
- 8) **Cooper, H. S.** : Peanut lectin-binding site in large bowel carcinoma. *Lab. Invest.* **47** : 383-390, 1982.
- 9) **Boland, C. R., Montgomery, C. K. and Kim, Y. S.** : A cancer-associated mutin alternation in benign colonic polyps. *Gastroenterology* **82** : 664-672, 1982.
- 10) **Beppu, H., Nakajima, M., Nishiyama, F., Uono, M. and Hirano, H.** : Concanavalin A binding sites on the erythrocytes of normal and genetically dystrophic chikins. *J. Neurol. Sci.* **59** : 401-414, 1983.
- 11) 辻勉 : レクチンの糖結合性. *臨床検査* **39** : 23-28, 1995.
- 12) 平野寛, 高田邦昭 : レクチンの組織化学的応用. *組織細胞化学* : 113-132, 1983.
- 13) **Harry, S.** : Peanut lectin-binding sites in large bowel carcinoma. *Lab. Invest.* **47** : 383-389, 1982.
- 14) **Hyun, K. H., Nakai, M., Kawamura, K. and Mori, M.** : Histochemical studies of lectin binding patterns in keratinized lectins, including malignancy. *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* **402** : 337-351, 1984.
- 15) **Ito, N., Yokota, M., Nagaike, C., Morimura, Y., Hatake, K. and Matsunaga, T.** : Histochemical demonstration and analysis of poly-N-acetylactosamine structures in normal and malignant human tissues. *Histol. Histopathol.* **11** : 203-214, 1996.
- 16) **Miyake, M., Kohno, N., Nudelman, E. D. and Hakomori, S.** : Human Ig G3 monoclonal antibody directed to an unbranched repeating type 2 chain (Gal β 1-4 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-R) which is highly expressed in colonic and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **49** : 5689-5695, 1989.
- 17) **Picrd, J., Edward, D. W. and Feizi, T.** : Changes in the expression of the blood group A, B, H, Le^a and Le^b antigens and the blood group precursor associated I (MA) antigen in glycoprotein-rich extracts of gastric carcinomas. *J. Clin. Lab. Immunol.* **1** : 119-128, 1978.
- 18) **Kapadia, A., Feizi, T. and EVANS, JM.** : Changes in the expression and polarization of blood group I and i antigen in post-implantation embryos and teratocarcinomas of mouse associated with cell differentiation. *Exp. Cell Res.* **131** : 185-195, 1981.
- 19) **Crowley, J. F., Goldstein, I. J., Arnep, J. and Lonngren, J.** : Carbohydrate binding studies on the lectin from *Datura stramonium* seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **231** : 524-533, 1984.
- 20) **Merkle, R. K. and Cummings, R. D.** : Relationship of the terminal sequences of the length of poly-N-acetyl lactosamine chains in asparagine-linked oligosaccharides from the mouse lymphoma cell line BW25147. Immobilized tomato lectin interact with high affinity with glycopeptides containing long poly-N-acetyl lactosamine chains. *J. Biol. Chem.* **262** : 8179-8189, 1987.
- 21) **Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S. and Kobata, A.** : Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis. *J. Biol. Chem.* **259** :

- 10834-10840, 1984.
- 22) Lee, N., Wang, W. -C. and Fukuda, M.: Granulocytic differentiation of HL-60 cell is associated with increase of poly-N-acetyl-lactosamine in Asn-linked oligosaccharides attached to human lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **265**: 20476-20487, 1990.
- 23) Irimura, T. and Nicolson, G. I.: Interaction of pokeweed mitogen with poly-N-acetyl-lactosamine)-type carbohydrate chains. *Carbohydr. Res.* **120**: 187-195, 1983.
- 24) Dutt, A., Tang, J. P. and Carson, D. D.: Estrogen preferentially simulates lactosaminoglycan-containing oligosaccharide synthesis in mouse uteri. *J. Biol. Chem.* **263**: 2270-2279, 1988.
- 25) Muramatsu, H. and Muramatsu, T.: Analysis of glyco protein-bound carbohydrates from pluripotent embryonal carcinoma cell by pokeweed agglutinin agarose. *J. Biochem.* **107**: 629-634, 1990.
- 26) Umetsu, K., Yamashita, K., Suzuki, J., Yamashita, T. and Suzuki, T.: Purification and characterization of an N-acetyl-lactosamine specific lectin from larvae of a moth, *phalera flavescens*. *Archives of biochemistry and biophysics.* **301**: 200-205, 1993.
- 27) Allen, A. K. and Neuberger, A.: *Biochem. J.* **135**: 307, 1973.
- 28) Monsigny, M., Moche, A. C., Sene, C. Maget-Dana, R. and Delmotte, F.: Sugar-lectin interactions: how dose wheat germ agglutinin bind sialoglycoconjugates. *Eur. J. Biochem.* **104**: 147-153, 1980.
- 29) Solter, D. and Knowles, B. B.: Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 5565-5569, 1978.
- 30) 桜井一成, 綿織吉郎, 川口学永, 小林 晏: 口腔扁平上皮癌におけるレクチン結合. 厚生年金病院年報 **17**: 411-420, 1990.
- 31) 陳英輝: 腎癌レクチンによる糖組織化学的研究. 日泌尿会誌. **77**: 1405-1415, 1986.
- 32) 金春順, 大石公子, 鶴飼幸太郎, 松倉康男, 矢谷隆一: 鼻副鼻腔粘膜における複合糖質—正常, 腫瘍について—. 耳鼻臨床 **80**: 1129-1136, 1987.
- 33) Sobrinho-Simoes, M., Sambade, C., Nesland, J., MHolm, R. and Damjanov, I.: Lectin histochemistry and ultrastructure of medullary carcinoma of the thyroid gland. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **114**: 369-375, 1990.
- 34) 王振海: 喉頭癌組織における糖鎖発現様式. 日耳鼻会報. **98**: 1781-1787, 1995.
- 35) Alvarez-Fernandez, E. and Carretero-Albinana, L.: Lectin histochemistry of normal broncho pulmonary tissues and common forms of bronchogenic carcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **114**: 475-481, 1990.
- 36) 山下克子: グリコパソロジーシリーズ6. 講談社, 東京, p. 50-65, 1993.
- 37) Hakomori, S.: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu. Rev. biochem.* **50**: 733-764, 1981.
- 38) 神奈木玲児, 三宅正幸, せん田晃一, 森由美子: 糖鎖抗原と悪性腫瘍. 化学と生物 **26**: 220-234, 1988.
- 39) 福岡和也, 米田尚弘, 鴻池義純, 友田恒一, 吉川雅則, 堅田 均, 成田亘啓, 今井照彦, 飯岡壮吾: 非小細胞肺癌組織におけるレクチン結合性の検討. 肺癌 **34**: 161-170, 1994.
- 40) 川崎敏祐, 何艶玲: グリコパソロジーシリーズ2. 講談社, 東京, p. 195, 1993.
- 41) Yogeewaran, G and Salk, P. L.: Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science* **212**: 1514-1516, 1981.
- 42) 阪本晴彦, 齊藤勝弘, 宇田弘治, 田中澄子, 桑原宏子: レクチン組織化学による腫瘍悪性度に関する研究. 頭頸部腫瘍 **19**: 71-74, 1993.
- 43) Reading, C. L., Belloni, P. N. and Nicolson, G. L.: Selection and in vivo properties of Lectin-attachment variants of malignant murine lymphosarcoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**: 1241-1249, 1980.
- 44) 相川正造, 翠川修共著: 肺臓疾患の病理と臨床—生検を中心に—. 南山堂, 東京, p 246, 1982.
- 45) 下里幸雄: 外科病理学. 第2版, 文光堂, 東京, p 205, 1992.
- 46) Krusius, T., Finne, J. and Rauvalva, H.: *Eur. J. Biochem.* **92**: 289, 1978.
- 47) Jarnetfelt, J., Rush, J., Li, Y. -T. and Laine, R. A. *J. Biol. Chem.* **253**: 8006, 1978.

- 48) **Finan, P. J., Wight, D. G., Lennox, E. S., Sacks, S. H. and Bleehen, N. M.** : Human blood group isoantigen expression on normal and malignant gastric epithelium studied with anti A and anti B monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.* **70** : 679-685, 1983.
- 49) **Chapman, C. M., Allhoff, E. P., Proppe, K. H. and Prout, G. R. Jr.** : Use of monoclonal antibodies for the localization of tissue isoantigens A and B in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *J. Histochem. Cytochem.* **31** : 557-561, 1983.
- 50) **Wiley, E. L., Mendelsohn, G. and Eggleston, J. C.** : Distribution of carcino embryonic antigens and blood group substances in adenocarcinoma of the colon. *Lab. Invest.* **44** : 507-513, 1981.
- 51) **Davidsohn, I.** : Early immunologic diagnosis and prognosis of carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **57** : 715-730, 1972.
- 52) **Ogawa, J., Iwasaki, M., Inoue, H., Koide, S., Kawada, S. and Shohtsu, A.** : Relation of ABH blood group antigen expression to prognosis in lung carcinoma. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **12** : 49-54, 1987.
- 53) **Yuan, M., Itzkowitz, S. H., Palekar, A., Shamsuddin, A. M., Phelps, P. C., Trump, B. F. and Kim, Y. S.** : Distribution of blood group antigen A, B, H, Lewis^a, and Lewis^b in human normal, fatal and malignant colonic tissue. *Cancer Res.* **45** : 4499-4511, 1985.
- 54) 松尾昭一 : レクチン並びに血液型物質に対するモノクローナル抗体によるヒト大腸癌の免疫組織化学的検索. *鹿児島大学医学雑誌* **40** : 267-279, 1989.
- 55) **Sorrell, J. M., Catterson, B., Caplan, A. I., Davis, B. and Schafer, A. I.** : Human keratinocytes contain carbohydrates that are recognized by keratan sulfate-specific monoclonal antibodies. *J. Invest. Dermatol.* **95** : 347-352, 1990.
- 56) **Varsano, S., Basbaum, C. B., Forsberg, L. S., Borson, D. B., Caughey, G. and Nadel, J. A.** : Dog tracheal epithelial cells in culture synthesize sulfated macromolecular glycoconjugates and release them from the cell surface upon exposure to extracellular proteinases. *Exp. Lung Res.* **13** : 157-184, 1987.
- 57) **Davies, J. R., Gallagher, J. T., Richardson, P. S. and Sheehan, J. K.** : Muchins in cat airway secretions. *Biochem. J.* **275** : 663-669, 1991.
- 58) 江原孝史, 勝山努 : 抗ケラタン硫酸モノクローナル抗体による顆粒細胞腫の特異的染色性についての検討. *日本病理学会誌.* **77** : 256, 1988.
- 59) **Carson, D. D., Tang, J. -P., Julian, J. and Glasser, S. R.** : **Vectorial secretion of proteoglycans by polarized rat uterine epithelial cells.** *J. Cell Biol.* **107** : 2425-2435, 1988.
- 60) **Cole, G. J. and McCabe, C. F.** : Identification of a developmentally regulated keratan sulfate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurine outgrowth. *Neuron* **7** : 1007-1018, 1991.
- 61) **Kapoor, R. and Prehm, P.** : Changes in proteoglycan composition of F9 teratocarcinoma cell upon differentiation. *Eur. J. Biochem.* **137** : 589-595, 1983.
- 62) **Mehmet, H., Scudder, P., Tang, P. W., Housell, E. F., Catterson, B. and Feizi, T.** : The antigenic determinants recognized by three monoclonal antibodies to keratan sulfate involve sulphated hepata or larger oligosaccharides of the poly (N-acetyllactosamine) series. *Eur. J. Biochem.* **157** : 385-391, 1986.
- 63) **Ito, N. and Hirota, T.** : Histochemical and cytochemical localization of blood group antigen. *Progr. Histochem. Cytochem.* **25** : 1-85, 1992.
- 64) **Ito, N., Yokota, M., Kawahara, S., Morimura, Y., Hirano, Y., Nagaik, C., Uchda, K., Hirota, T. and Matsnaga, T.** : Histochemical demonstration of endo- β -galactosidase susceptible poly-N-acetyl-lactosamine with the blood group specificities in papillary carcinoma of the human thyroid gland. *Acta Histochem. Cytochem.* **27** : 451-458, 1994.
- 65) **Ito, N., Yokota, M., Kawahara, S., Nagaike, C., Morimura, Y., Hirota, T. and Matsunaga, T.** : Histochemical demonstration of different types of poly-N-acetyllactosamine structures in human thyroid neoplasmas by using lectins and end- β -galactosidase digestion. *Histochem. J.* **27** : 620-629, 1995.
- 66) **Ito, N., Yokota, M., Nagaike, C., Morimura, Y., Hatake, K. and Matsunaga, T.** : Histo-

- chemical demonstration and analysis of poly-N-acetyllactosamine structures in normal and malignant human tissues. *Histol. Histopathol.* **11** : 203-214, 1996.
- 67) **Yokota, M., Ito, N., Hirota, T., Yane, K., Tanaka, O., Miyahara, H. and Matsunaga, T.** : Histochemical differences of the lectin affinities of backbone poly lactosamine structures carrying the ABO blood group antigens in papillary carcinoma and other types of thyroid neoplasmas. *Histochem. J.* **27** : 139-147, 1995.
- 68) **Ito, N., Yokota, M., Nagaike, C., Morimura, Y., Hatake, K., Tanaka, O. and Matsunaga, T.** : Simultaneous expression of keratan sulphate epitope (a sulphated poly-N-acetyllactosamine) and blood group ABH antigens in papillary carcinomas of the human thyroid gland. *Histochem. J.* **613-623**, 1996.