

腫瘍マーカー mAb20D11 のヒト腺系腫瘍組織における反応性の検討

田 淵 順 治

An investigation on Reactivity of Tumor-Associated Marker (mAb20D11) against Human Tumor Tissues of Glandular Origin

Junji Tabuchi

(平成8年3月31日受付)

緒 言

近年、ヒト腺腫瘍組織から得たタンパクや糖タンパクを抗原とする抗血清あるいはモノクローナル抗体が作製され、それらをヒト腫瘍組織に用いた免疫組織化学的研究が多数報告されている¹⁻⁶⁾。それらのうち、CEA⁷⁻⁹⁾、 α -fetoprotein^{10,11)}、CA 19-9^{12,13)}などは、腫瘍マーカーとして実際の臨床に 응용されている。特に、CEA は胎児性抗原と考えられ、横崎⁹⁾、山原¹⁴⁾は、腫瘍組織と胎児組織に対する反応性の比較に基づいて、その発現と腫瘍組織の発生過程や生物学的悪性度との相関性についての免疫組織化学的検索結果を報告している。

一方、唾液腺腫瘍組織に対する免疫組織化学的検索では、アマラーゼ^{15,16)}を始めとする各種機能タンパクや、細胞骨格タンパクに対する抗体によるものが多いが、一方、腺上皮の細胞膜成分に対する抗体を用いた研究はほとんど見られない。

以上の観点から本研究では、I. ヒト胃癌由来培養細胞株 TMK-1¹⁷⁾ を免疫原として作製したマウスモノクローナル抗体 20D11¹⁸⁾ (以下 mAb20D11 と略) を作製し、同抗体の TMK-1 に対する反応性を検索し、次いで、II. 胎児と成人の胃と肺の正常と腫瘍組織に対する mAb20D11 の反応性、および各種ヒト胃癌由来培養細胞株に対する抗原分子量を検索し、さらに、III. 胎児および成人の正常顎下腺と唾液腺腫瘍組織に対する mAb20D11 の反応性の検索を行ない、IV. 腫瘍マーカーである上皮膜抗原 (以下、EMA と略)¹⁹⁾

ならびに癌胎児性抗原 (以下、CEA と略)^{8,9)} の発現様相と比較検討した。

材料ならびに実験法

I. 腫瘍マーカー (mAb20D11) の作製法と、抗原細胞に対する反応性の検討法

1. mAb20D11 の作製法

mAb20D11 作製の免疫原とした TMK-1 は、落合ら¹⁷⁾により樹立されたヒト胃低分化型腺癌由来培養細胞株であり、ガストリンにより増殖促進を示し、超微形態学的には細胞内分泌細管を有して胃壁細胞への分化を示す細胞株である。この培養細胞を用いて Köhler と Milstein^{20,21)}の方法により、モノクローナル抗体を作製するとともに、抗体のサブクラスを決定した。すなわち、Freund's complete adjuvant と混和した 10⁶ 個の TMK-1 細胞を、マウス (Balb/c) の腹腔内に10日の間隔をおいて2回注入し、免疫した。このマウスから得られた脾細胞とミエローマ細胞株 (P3-X63-Ag8U1) を polyethylene glycol (PEG4000) を用いて細胞融合させ、ハイブリドーマを得た。ハイブリドーマを限界希釈法により単クローンとして培養後、ELISA assay を行ない、TMK-1 細胞膜分画に免疫活性を呈するクローンのみを選択した。さらに、この単クローンハイブリドーマをマウスの腹腔内に注入し、腹水から硫酸沈澱法によりグロブリン分画を得て、Sephacryl S-300 によるゲル濾過法で、モノクローナル抗体を精製した。

2. TMK-1 に対する反応性の検討法

超微免疫組織化学的検索の多くは Nakane & Pierce²²⁾の考案したペルオキシダーゼ標識抗体法により行なわれてきた。しかし、本法では、酵素反応の結果生じるオスミウムブラックの電子密度が比較的低い

広島大学歯学部口腔外科学第二講座 (指導: 下里常弘教授) 本論文の要旨は昭和63年9月第47回日本癌学会総会において発表した。

ため、鉛などによる電子染色を併用できないという欠点がある。著者は、この欠点を解決するために電顕観察のための新しい免疫染色法を考案し、TMK-1における mAb20D11 に反応する抗原物質の局在を検討した。さらに、TMK-1 における抗原分子性状を解析するために、TMK-1 より抽出したタンパクの Western blotting²³⁾ と等電点電気泳動を行ない、抗原物質の分子量と等電点を解析した。すなわち、10% FCS を含む RPMI 1640 培地中でスライドガラス上に培養した TMK-1 細胞を periodate-lysine-paraformaldehyde 固定法 (以下、PLP 固定と略)²⁴⁾ で固定を行なったのち、0.05M phosphate buffer (pH 7.4, 4°C) (以下、PB と略) で緩衝した 0.01M の sodium metaperiodate により hydroxide 基を aldehyde 基に酸化後、0.15M L-lysine monohydrochloride (0.05M PB にて緩衝, pH 7.4, 4°C) で cross-link し、2% paraformaldehyde (0.075M PB にて緩衝, pH 7.4, 4°C) で固定した。固定後、0.1M PB (pH 7.4, 4°C) で 1 時間洗浄し、酵素抗体間接法で免疫染色を施した。この際、mAb20D11 を 1 次抗体、アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgM ヤギ抗血清 (カベル社製) を 2 次抗体として用い、Mayahara ら²⁵⁾ の原法をもとに著者の考案した、“alkaline phosphatase PbPO₄ precipitating method” (以下、ALP-Pb 法と略) (表 1) により染色を行なった。すなわち、2 次抗体の反応後、0.05M PB (pH 7.4, 4°C) にて洗浄し、1% glutaraldehyde (0.05M PB にて緩衝, pH 7.4, 4°C) で 1 時間固定後、0.01M cacodylate buffer (pH 7.4, 4°C 中に浸漬してリン酸イオンを除去した。さらに、0.6% sodium β-glycerophosphate, 0.1% magnesium sulfate および 0.2% lead citrate を含む反応液 (0.2M Tris buffer にて緩衝, pH 9.2, 37°C) 中で酵素反応を行なった。ついで 0.2% osmic acid (0.1M PB にて緩衝, pH 7.4, 20°C) による後固定後、50-100% ethanol 系列にて脱水、Epon 812 に包埋した。超薄切片にクエン酸鉛による電子染色を施し、電子顕微鏡 (JEM-100 S, 日本電子社製) で鏡検した。さらに、抗原の分子性状の解析のため、TMK-1 を 0.5% Nonide P-40 と 0.02% NaN₃ を含む 10 mM Tris buffer (pH 7.4, 0°C) 中でホモジェナイズ後、30 分間放置し、2,700×g にて 20 分間遠心して上清を採取した。抽出タンパクの定量には Protein assay kit (BioRad 社製) を用いた。3-5% gradient gel を用いた電気泳動により分子量解析を行ない、かつ Sepharose CL-4B を用いたゲル濾過により抗原物質の精製し、Pharmalyte (pH 3-10) 添加 3% agarose gel 上で、1,500 volt·hour 泳動後、Western blotting を行ない、抗原分子の等電点を計測した。

表 1 電顕観察のための免疫染色法 (ALP-Pb 法)

1. PLP 固定
 - 1) 0.01M 過ヨウ素酸ナトリウムによる水酸基の酸化
 - 2) 0.1M L-lysine による aldehyde 基の cross-link
 - 3) 2.0% paraformaldehyde による固定
2. 10, 15, 20% sucrose, PBS (pH 7.4) にて 1 時間ずつ洗浄*
3. 5% glycerol を含む 20% sucrose, PBS (pH 7.4) にて 1 時間洗浄*
4. 液体窒素を冷媒として OCT compound 中に包埋*
5. クリオスタットに 6 μm に薄切し、スライドガラス上に貼付*
6. PBS にて洗浄
7. 10% ヤギ血清にて 30 分間 masking
8. 1 次抗体を 4°C で 10 時間反応
9. 10% saccharose を含む PBS にて 10 分間 3 回洗浄
10. 2 次抗体を 4°C で 10 時間反応
11. 10% sucrose を含む PBS にて 10 分間 3 回洗浄
12. 1% glutaraldehyde PBS にて 1 時間固定
13. 0.05M TBS にて 20 分間 3 回洗浄してリン酸イオンを除去
14. 15 分間 ALP-Pb medium** 中にて酵素反応
15. 0.01M カゴジレート緩衝液にて 20 分間 3 回洗浄
16. 2% オスミウム酸にて 60 分間後固定
17. 50-100% ethanol にて脱水
18. Epon 812 中に包埋
19. 薄切, 電子染色後検鏡

* 2, 3, 4, 5 は TMK-1 では行わない

** ALP-Pb medium

0.1M Tris-buffer, pH 9.3

0.6% Sodium β-glycerophosphate

0.1% Magnesium sulfate

0.5% Lead citrate

II. 胃, 肺の正常と腫瘍組織, および培養細胞株に対する mAb20D11 の反応検索法

胃と肺の胎児 (胎生 4-10 カ月) および成人の正常組織ならびに胃癌 133 例 (高分化型腺癌 51 例, 低分化型腺癌 82 例), 肺胞上皮癌 58 例 (表 2) を用いて, 酵素抗体間接法²⁶⁾ (表 3) による免疫染色を行なった。さらに, 胃, 肺の正常組織およびヒト胃癌 3 例, 肺胞上皮癌 1 例の新鮮凍結材料ならびに胃の高分化型腺癌由来培養細胞株 (MKN 1²⁷⁾, MKN 7²⁷⁾, MKN 74²⁷⁾) と低分化型腺癌由来培養細胞株 (KATO-III²⁸⁾, MKN 45²⁷⁾) (表 4) から, 前述の方法でタンパク抽出を行ない, Western blotting により抗原の分子量を検索した。

表2 mAb20D11による免疫染色に適用した胃と肺の正常および腫瘍組織

tissue	case number
stomach	
fetal tissue	
4, 5, 6, 8, 10 gestation month	3
adult normal tissue	5
cancer tissue	
well differentiated adenocarcinoma	51
poorly differentiated adenocarcinoma	82
lung	
fetal tissue	
4-10 gestation month	3
adult normal tissue	5
alveolar cell carcinoma	58

表3 顕微鏡観察のための免疫染色法

1. 組織を10% formalin にて固定
2. 水洗後, 50-100% の ethanol にて脱水し, xylene で透徹, paraffin 中に包埋
3. paraffin block から 4 μ m の切片作製
4. 0.3% 過酸化水素を含む methanol 中に10分間浸漬して内因性 peroxidase を block
5. 10% ヤギ血清にて30分間 masking
6. 1次抗体で60分間反応
7. PBS にて10分間, 3回洗浄
8. 2次抗体で60分間反応
9. PBS にて10分間, 3回洗浄
10. 0.03% 過酸化水素と 0.01% DAB を含む 0.05M TBS 中で酵素反応
11. methyl green にて後染色し, 検鏡

Ⅲ. 正常顎下腺と唾液腺腫瘍に対する mAb20D11 の反応検査法

ヒト胎児(4-10カ月)ならびに成人正常顎下腺組織および唾液腺腫瘍組織148例(腺腫89例, 粘表皮腫10例, 腺癌49例)の10%ホルマリン固定標本(表5)と, 成人正常顎下腺3例, 唾液腺腫瘍組織7例(腺腫4例, 粘表皮腫1例, 腺癌2例)のPLP固定凍結材料を用いて酵素抗体間接法による免疫染色を行なった。PLP固定凍結材料は前述したALP-Pb法を用いた免疫染色を行ない, 電顕で鏡検した。

表4 Western blotting に用いた材料

tissue	case number
stomach	
normal tissue	3
cancer tissue	
well differentiated adenocarcinoma	2
poorly differentiated adenocarcinoma	1
lung	
normal tissue	1
alveolar cell carcinoma	1
gastric cancer cell lines	
well differentiated adenocarcinoma origin	
MKN1, MKN7, MKN74	
poorly differentiated adenocarcinoma origin	
MKN45, KATO-III	

表5 mAb20D11による免疫染色を適用した顎下腺組織と唾液腺腫瘍組織

tissue	case number
fetal submandibular gland	
4, 5, 6, 8, 10 th gestation month	3
adult submandibular gland adenomas	15(3)
pleomorphic adenoma	50(2)
monomorphic adenoma	39(2)
mucoepidermoid tumor	10(1)
carcinomas	
adenoid cystic carcinoma	22
adenocarcinoma	27(2)

() 内は電顕による観察症例

Ⅳ. 正常顎下腺と唾液腺腫瘍に対する EMA, CEA の反応性の検査法

成人正常顎下腺組織10例および唾液腺腫瘍組織125例(腺腫66例, 粘表皮腫10例, 腺癌49例)(表6)の10%ホルマリン固定, パラフィン包埋材料に対して, 抗EMAおよび抗CEAマウスモノクローナル抗体(DAKO社, 持田製薬社製)の反応性を酵素抗体間接法により検索した。

表 6 EMA, CEA の免疫染色に用いた顎下腺組織と唾液腺腫瘍組織

tissue	case number
normal submandibular gland	10
adenomas	
pleomorphic adenoma	32
monomorphic adenomas	
adenolymphoma	20
other types	14
mucoepidermoid tumor	10
carcinomas	
adenoid cystic carcinoma	22
adenocarcinomas	
well differentiated	15
poorly differentiated	12

結 果

I. mAb20D11 の性状と, TMK-1 に対する反応結果

1. mAb20D11 の生化学的特性

以上の実験法により得られた mAb20D11 のサブクラスは IgM, κ であることが判明した。

2. TMK-1 に対する mAb20D11 の反応性

電顕観察により mAb20D11 は TMK-1 の細胞膜に存在する抗原を認識することが明らかとなった (図 1)。また, 同抗原は 300 kD 以上の 3 種類の分子量を有し (図 2), その等電点は pI 5.85-6.55 であった (図 3)。

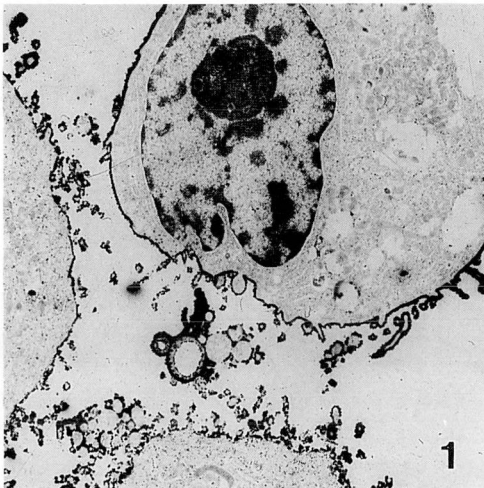


図 1 TMK-1 における mAb20D11 の免疫電顕像
細胞膜に存在する抗原を認識していた。
×3,000

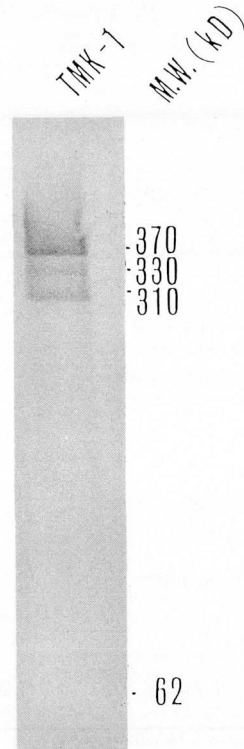


図 2 TMK-1 からの抽出タンパクの Western blotting
TMK-1 より抽出されたタンパクの mAb20D11 に対する抗原物質は 300 kD 以上の 3 つの分子量を有していた。

II. 胃, 肺の正常と腫瘍組織, 胃癌由来培養細胞株に対する mAb20D11 の反応結果 (表 7, 8)

1. 正常胃組織に対する反応性;

胎生 5 カ月以前の未熟な胃組織では, 全被覆上皮の内腔側細胞膜が陽性を呈した (図 4A)。

一方, 胎生 6 カ月以後および成人の組織では, 壁細胞のみが陽性を呈した (図 4B, C)。

2. 正常肺組織に対する反応性;

胎児の未熟な肺胞組織では, 原始肺胞組織を構成する上皮細胞の肺胞内腔側の細胞膜全体に陽性であった (図 5A)。

成人では, II 型肺胞上皮細胞 (大肺胞細胞) の細胞膜のみが陽性を呈した (図 5B)。

3. 胃癌組織に対する反応性;

高分化型腺癌では 51 例中 45 例に陽性細胞の出現が認められた。反応部位は胎児組織とよく似た形態を示す腫瘍組織の内腔側細胞膜に限局していた (図 6A)。低分化型腺癌では 81 例中 53 例に陽性所見が認められた。反応部位は腫瘍細胞の細胞膜全表面および印環細胞癌に見られるような細胞内分泌顆粒限界膜であった (図

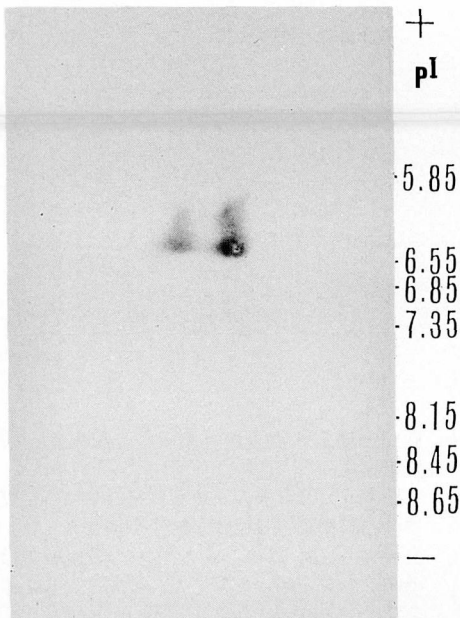


図3 TMK-1からの抽出タンパクの等電点電気泳動
TMK-1より抽出されたタンパクの
mAb20D11に対する抗原物質の等電点は pI
5.85-6.55であった。

6B)。

4. 肺胞上皮癌に対する反応性；

肺胞上皮癌では58例中49例に陽性所見が観察された。反応部位は、胃の高分化型腺癌におけると同様に、胎児組織に類似した形態を示す腫瘍組織の肺胞様腔の全被覆上皮の内腔側細胞膜であった(図7)。

5. 胃と肺の正常と腫瘍組織、および培養細胞株の
抗原分子量の検索結果；

(1) 胃の正常と腫瘍組織；正常胃粘膜組織では、本抗体に対する抗原物質は62 kDの分子量を示した。胃癌組織では分化程度に関係なく、62 kDの抗原は証明されず、300 kD以上の大きい分子量を有する抗原のみが出現した(図8)。

(2) 胃癌由来培養細胞株；培養細胞株では由来する組織の分化程度に関係なく、62 kDの抗原は証明されず、300 kD以上の大きい分子量を有する抗原のみが出現した(図9)。

(3) 肺の正常と腫瘍組織；正常肺組織では、本抗体に対する抗原物質は、62, 280 および 330 kDの3種の分子量を示した。一方、肺胞上皮癌では、300 kD以上の分子量を有する抗原のみが観察された(図10)。

表7 胃と肺の正常組織における mAb20D11 の反応性

tissue	positive portion	western blotting (kD)	
stomach	fetal tissue		
	4, 5 th gestation month	luminal surface of epithelia	ND
	6, 8, 10 th gestation month	immature parietal cell	ND
	adult normal tissue	parietal cell	62
lung	fetal tissue	luminal surface of epithelia	ND
	adult normal tissue	type II cell	62, 280, 330

ND: not done

表8 胃と肺の腫瘍組織および胃癌由来培養細胞株における mAb20D11 の反応性

tissue	positive case (%)	Western blotting (kD)	
stomach	well differentiated adenocarcinoma	45/51 (88.2)	>300
	poorly differentiated adenocarcinoma	53/82 (64.6)	>300
lung	alveolar cell carcinoma	49/58 (84.5)	>300
gastric cancer cell line MKN74, MKN45, MKN7, MKN1, KATO-III			>300

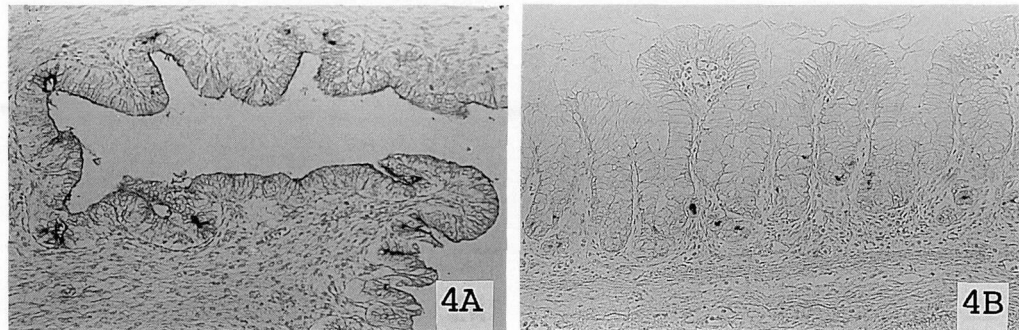


図4 胎児と成人の正常胃組織での mAb20D11 の免疫染色像

胎生5カ月以前の未熟な胃組織では、粘膜上皮の内腔側細胞膜全体が陽性を呈した (A)。胎生6カ月 (B) 以後と成人 (C) の胃組織では、壁細胞のみが陽性を呈した。A, B : $\times 100$, C : $\times 200$

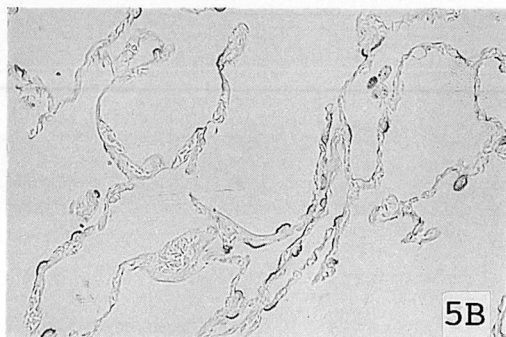
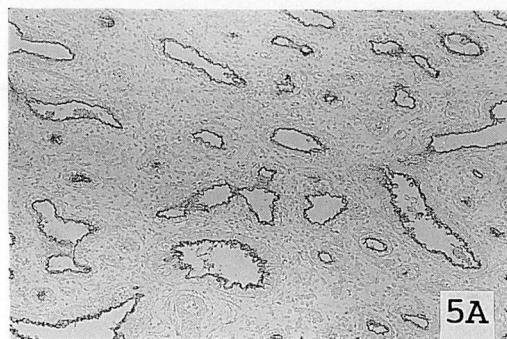
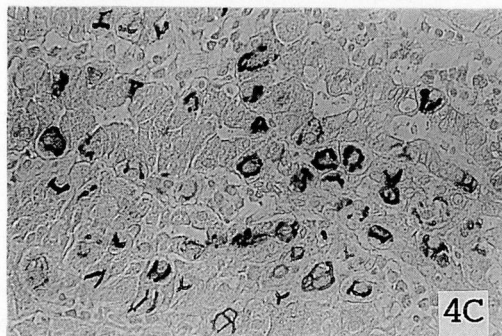


図5 胎児と成人の正常組織での mAb20D11 の免疫染色像

未熟な胎児の肺胞組織では、肺胞様腔を構成する上皮細胞の内腔側細胞膜全体が陽性を呈した (A)。成人では、II型肺胞上皮の細胞膜のみに陽性所見が限局していた (B)。A : $\times 100$, B : $\times 150$

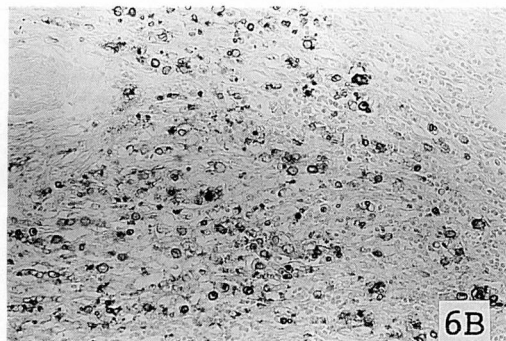


図6 mAb20D11 による胃癌組織の免疫染色像

高分化型腺癌の内腔側細胞膜が陽性を呈した症例 (A) や、低分化型腺癌の細胞膜全体や印環細胞癌の細胞内分泌顆粒限界膜が陽性を呈した (B) 症例があった。A, B : $\times 100$

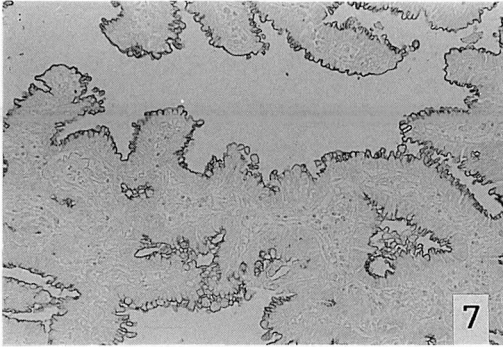


図7 mAb20D11による肺胞上皮癌の免疫染色像
胎児組織と類似した腫瘍組織の肺胞様腔の内腔側細胞膜に陽性を呈した症例。×100

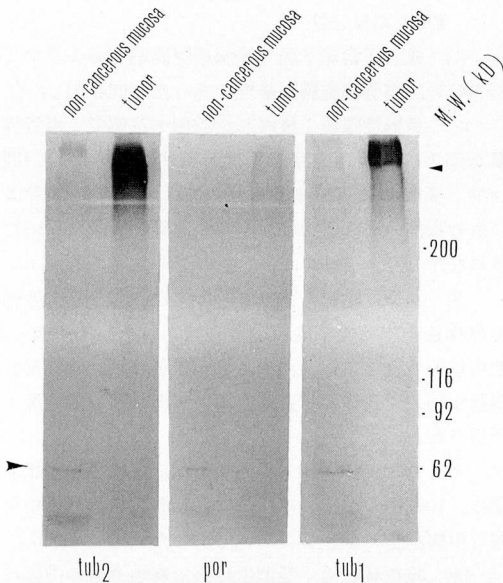


図8 正常胃粘膜と胃癌組織からの抽出タンパクのWestern blotting
正常胃粘膜の mAb20D11 に対する抗原物質の分子量は 62 kD を呈し、胃癌では腫瘍組織の分化程度に関係なく、300 kD 以上の抗原が観察された。

Ⅲ. 正常顎下腺と唾液腺腫瘍に対する mAb20D11 の反応結果

1. 正常顎下腺の反応性 (表9)

胎生5カ月以前の顎下腺組織では陽性所見が認められなかったが、胎生6カ月では多列上皮で裏層された原始導管上皮細胞の内腔側細胞膜に陽性反応が認められた(図11A)。胎生8カ月以後では、形態的に線条部導管様を呈する構造部の内腔側細胞膜のみが陽性を

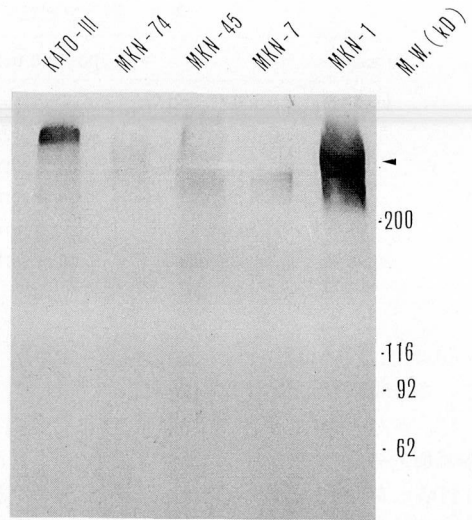


図9 ヒト胃癌由来培養細胞株からの抽出タンパクのWestern blotting
由来する腫瘍組織の分化程度に関係なく、mAb20D11 に大して 300 kD 以上の抗原のみが観察された。

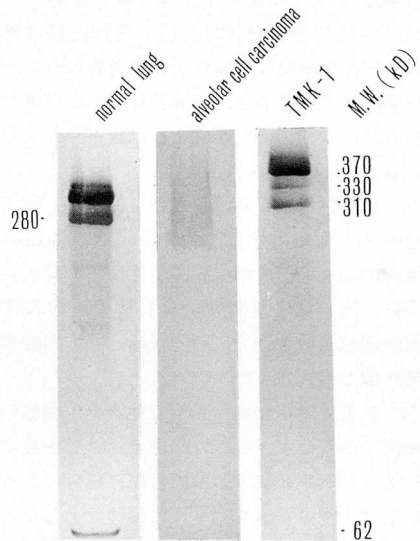


図10 正常肺および肺胞上皮癌からの抽出タンパクのWestern blotting
正常肺組織では、62, 280, 330 kD の3種の抗原物質が検出されたが、肺胞上皮癌では約300 kD の抗原のみが見られた。

呈した(図11B, C, D)。また、成人組織について電顕観察を行なったところ、線条部導管の内腔側細胞膜のみに反応が局限することが確認された。(図11E)。なお、陽性率は6, 7カ月では、検討例の67%, 8, 10

表9 顎下腺組織における mAb20D11 の反応性

tissue	positive portion	positive cases
fetal submandibular gland		
4, 5 th gestation month	not detected	0/3
6, 7 th gestation month	luminal surface of immature duct	2/3
8 th gestation month	luminal surface of immature striated duct	3/3
10 th gestation month	luminal surface of immature striated duct	3/3
adult submandibular gland		
	luminal surface of striated duct	15/15

カ月では100%であった。

2. 唾液腺腫瘍の反応性 (表10)

(1) 多形性腺腫；検討した50例の全てにおいて、導管様構造部の内腔側細胞膜に陽性所見が認められた(図12A)。索状増殖部での反応は、30例中10例で同部実質細胞の細胞質に陽性であった(図12B)。充実性増殖部が見られた37例では、8例でその部の腫瘍細胞の細胞質が弱陽性を呈した(図12C)。扁平上皮化生を呈した6例では、3例でその部の細胞の細胞膜が陽性を示した(図12D)。また、粘液腫様部では、35例中9例でその部の線維芽細胞様細胞の細胞質に(図12E)、軟骨様部では15例中1例で軟骨細胞様細胞の細胞質に陽性であった(図12F)。電顕的には導管様構造部の内腔側細胞膜に陽性所見が認められたが、索状増殖部、充実性増殖部、粘液腫様部および軟骨様部の構成細胞には明らかな陽性所見は観察されなかった(図12G)。

(2) 単形性腺腫；腺リンパ腫では25例全例で腺腔様構造の内腔側細胞膜に陽性であった(図13A)。また、電顕的にも同部の細胞膜に陽性反応が確認された(図13B)。他の単形性腺腫では14例中、索状腺腫2例、基底細胞腺腫2例で、導管様構造部の内腔側細胞膜に陽性像が観察された(図14)。

(3) 粘表皮腫；10例中9例で粘液産生細胞の細胞膜に陽性であったが、粘液は陽性を示さなかった。表皮様細胞は10例中8例で細胞膜全周に陽性であった。中間細胞は9例中6例で細胞膜に陽性であった。電顕的には、表皮様細胞の細胞膜全体に陽性所見が認められたが、粘液産生細胞や中間細胞での陽性所見は明らかにできなかった(図15A, B)。

(4) 腺様嚢胞癌；検索した22例全例で真性導管の内腔に面する細胞膜に陽性であったが、偽嚢胞部を形成する細胞および充実性に増殖する細胞では陽性所見は認められなかった(図16A)。

(5) 腺癌；腺腔形成が著明な比較的高分化の例では15例中13例で腺腔様構造部の内腔側細胞膜に陽性所見が認められた(図16B, C)。低分化の例でも12例中

10例で腫瘍細胞の細胞膜および分泌顆粒限界膜に陽性像が観察された(図16D)。

IV. 正常顎下腺と唾液腺腫瘍組織に対する EMA, CEA の反応性の検索結果 (表11, 12)

1. EMA の反応性

(1) 成人正常顎下腺；腺房細胞間細管および全ての導管の内腔側細胞膜に陽性であった(図17A)。

(2) 多形性腺腫；検討した32例中21例で、導管様構造部の内腔側細胞膜に陽性所見が認められた(図18A)。索状増殖部、充実性増殖部、粘液腫様部および軟骨様部の構成細胞には明らかな陽性所見は見いだされなかった。

(3) 単形性腺腫；腺リンパ腫では20例中8例で腺腔様構造の内腔側細胞膜に陽性であった(図19A)。他の単形性腺腫では14例中、索状腺腫2例、基底細胞腺腫1例で、導管様構造部の内腔側細胞膜に陽性像が観察された(図19B)。

(4) 粘表皮腫；10例中5例で粘液産生細胞の細胞膜に、10例中4例で表皮様細胞の細胞膜に、9例中2例で中間細胞の細胞膜に陽性であった(図20A, B)。

(5) 腺様嚢胞癌；22例中12例で真性導管の内腔に面する細胞膜に陽性であったが、偽嚢胞部を形成する細胞および充実性に増殖する細胞では陽性所見は認められなかった(図21A)。

(6) 腺癌；高分化型腺癌では15例中11例で腺腔様構造部の内腔側細胞膜に陽性所見が認められた(図21B)。低分化型腺癌では12例中9例が腫瘍細胞の細胞膜および分泌顆粒限界膜に陽性像が観察された(図21C)。

2. CEA の反応性

(1) 成人正常顎下腺；腺房細胞間細管および介在部導管の内腔側細胞膜に陽性であった(図17B)。

(2) 多形性腺腫；32例中8例で、導管様構造部の内腔側細胞膜に陽性所見が認められた(図18B)。索状増殖部、充実性増殖部、粘液腫様部および軟骨様部の構成細胞には明らかな陽性所見は見いだされなかつ

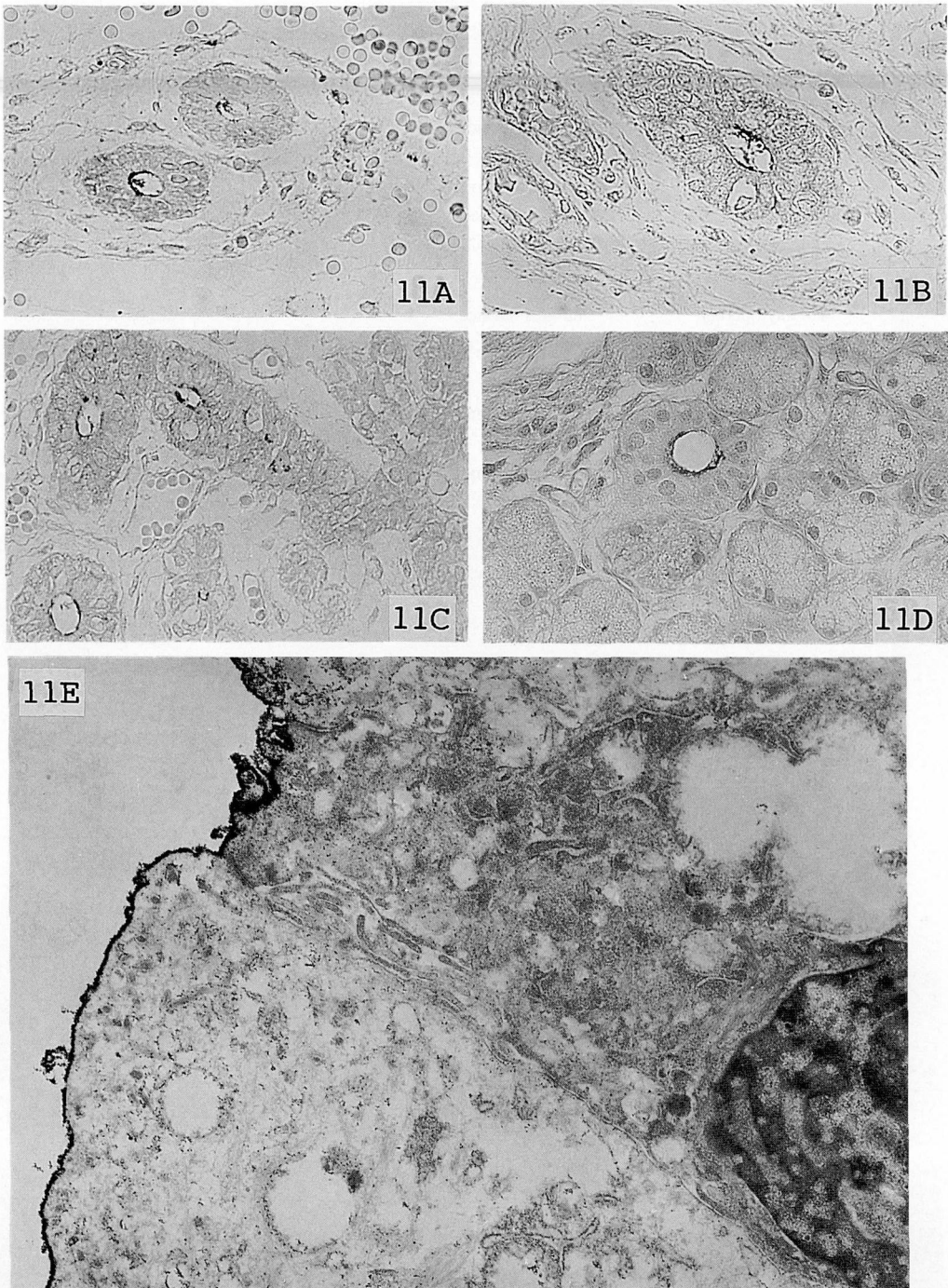


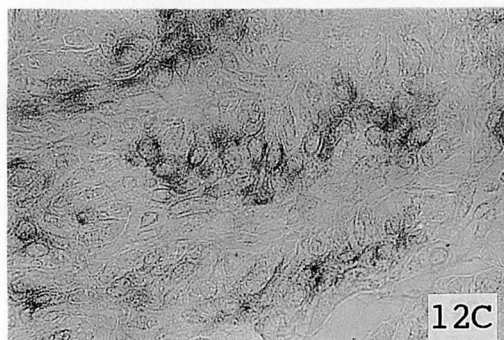
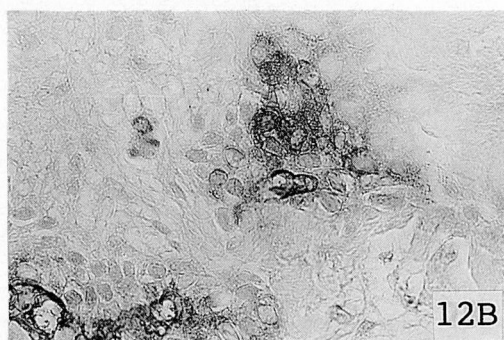
図11 胎児と成人の正常顎下腺組織における mAb20D11 による免疫染色像

胎生6カ月では多列上皮よりなる原始導管の内腔側細胞膜が陽性を呈し (A), 胎生8カ月以後では線条部導管様構造の内腔側細胞膜のみが陽性を示した (B, C, D). 電顕的には線条部導管の内腔側細胞膜が陽性であった (E).

A, D: $\times 200$, B, C: $\times 150$, E: $\times 8,000$

表10 唾液腺腫瘍組織における mAb20D11 の反応性

tissue	positive portion	positive cases
adenomas		
pleomorphic adenoma		
duct-like portion	luminal surface	50/50
trabecular portion	tumor cell body	10/30
solid portion	tumor cell body	8/37
myxoid portion	tumor cell body	9/35
chondroid portion	chondroid cell body	1/15
monomorphic adenoma		
adenolymphoma	luminal surface	25/25
other types	luminal surface	4/14
mucoepidermoid tumor		
mucus producing cell	cell membrane	9/10
epidermoid cell	cell membrane	8/10
intermediate cell	cell membrane	6/9
carcinomas		
adenoid cystic carcinoma		
true duct	luminal surface	22/22
pseudocyst		0/22
solid portion		0/22
adenocarcinomas		
well differentiated	luminal surface of duct-like portion	13/15
poorly differentiated	tumor cell membrane secretory granule	10/12



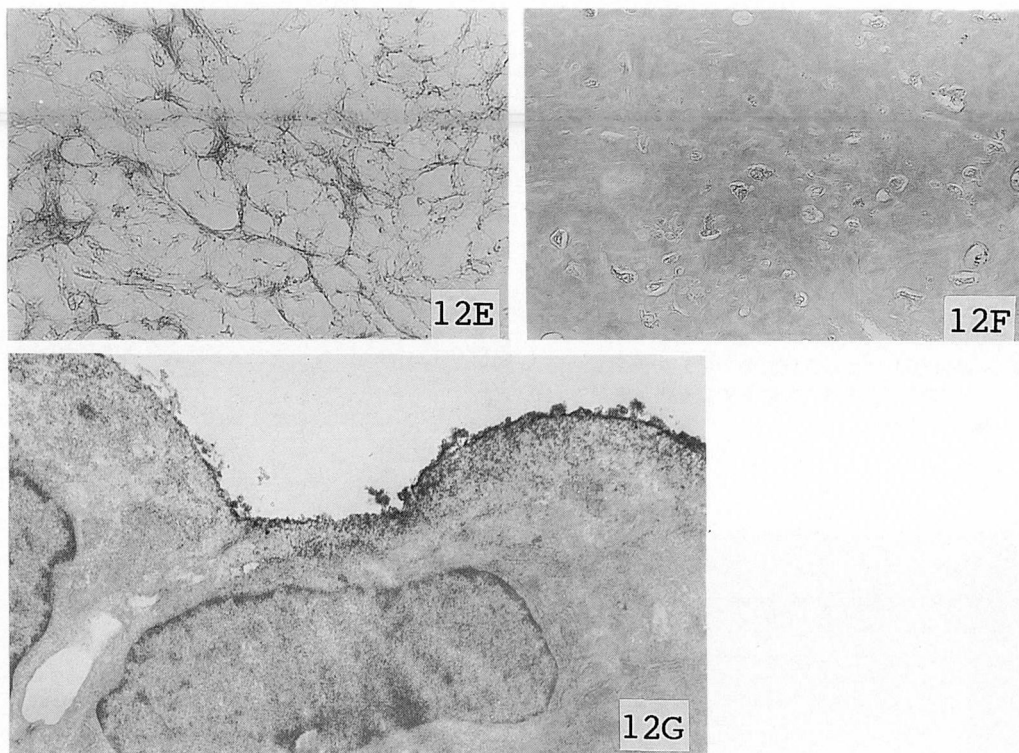


図12 mAb20D11による多形性腺腫の免疫染色像

導管様構造部では全例で内腔側細胞膜が陽性を呈した (A)。陽性率は様々であるが、索状増殖部では実質細胞の細胞質が陽性 (B)、充実性増殖部では細胞質が弱陽性 (C)、扁平上皮化生部では細胞膜が陽性であり (D)、粘液腫様部では線維芽細胞様細胞の細胞膜が陽性 (E)、軟骨様部では軟骨細胞様細胞の細胞質がまれに陽性を呈した (F)。電顕的にも、導管様構造部の細胞膜に陽性像が観察された (G)。

A, E: $\times 100$, B, C, D: $\times 200$, F: $\times 150$,
G: $\times 3,000$

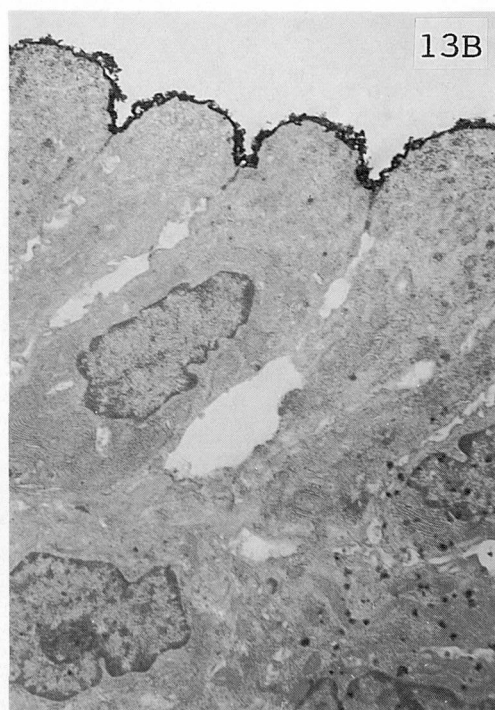


図13 mAb20D11による腺リンパ種の免疫染色像

腺腔様構造部の内腔側細胞膜は常に陽性を呈した (A)。電顕的にも腺管様構造部の内腔側細胞膜に陽性所見が認められた (B)。

A: $\times 150$, B: $\times 2,000$



図14 mAb20D11による索状腺腫の免疫染色像
導管様構造部の内腔側細胞膜が陽性を呈した例. ×200



図15 mAb20D11による粘液皮腫の免疫染色像
粘液産生細胞, 表皮様細胞, 中間細胞の細胞膜は, しばしば陽性を呈した (A). 電顕的には表皮様細胞の細胞膜全体に陽性像が観察された (B). A: ×200, B: ×3,000

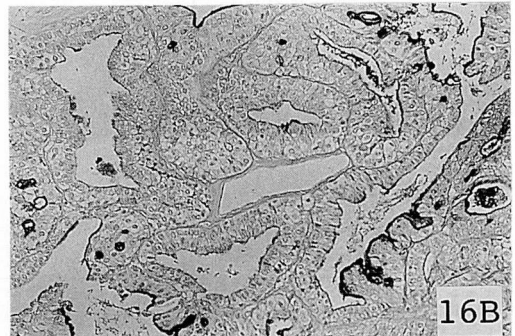
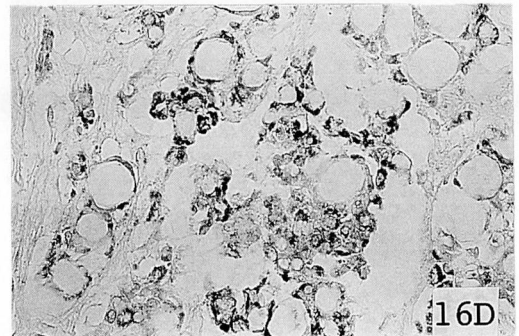


図16 mAb20D11による各種癌腫の免疫染色像
腺様嚢胞癌では真性導管の内腔側細胞膜が陽性を呈した (A). 高分化型腺癌では, 腺腔内腔側細胞膜に (B, C), 低分化型腺癌では腫瘍細胞の細胞膜全体 (D) に陽性を呈する例が見られた.

A, B: ×100, C: ×3,000, D: ×150



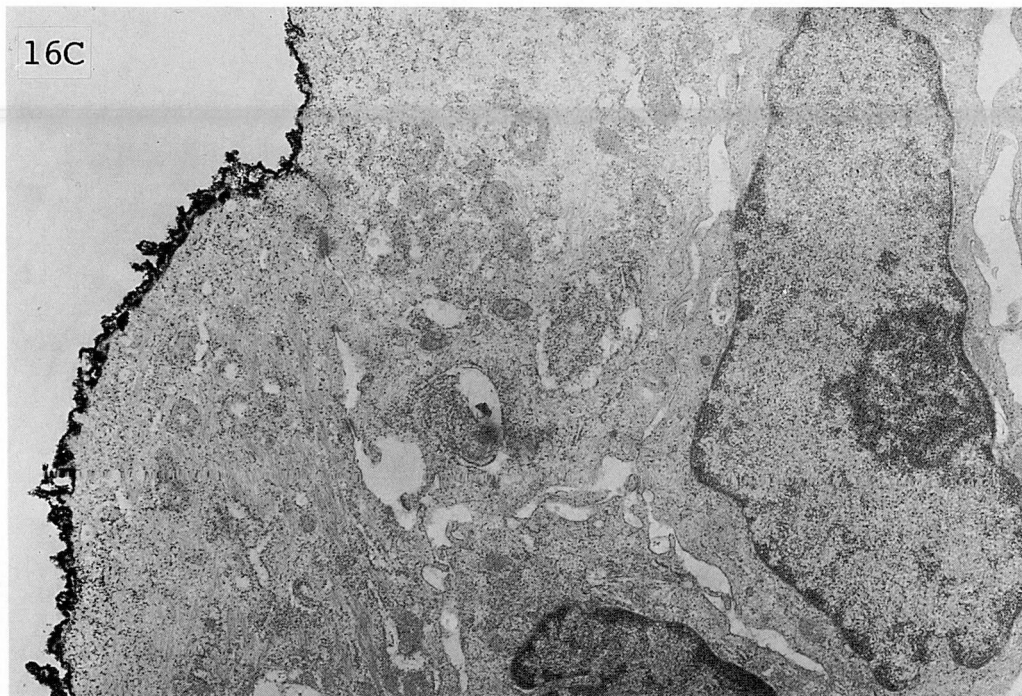


表11 成人顎下腺組織における EMA と CEA に対するモノクローナル抗体の反応性

antibody	positive portion
EMA	luminal surface of duct cell membrane of acinar cell
CEA	luminal surface of intercalated duct cell membrane of acinar cell

た。

(3) 単形性腺腫；腺リンパ腫を含めて、いずれの症例でも陽性所見は観察されなかった。

(4) 粘表皮腫；10例中2例で粘液産生細胞の細胞膜に、10例中2例で表皮様細胞の細胞膜に陽性であったのに対して、中間細胞が陽性を呈する症例はなかった（図22A, B）。

(5) 腺様嚢胞癌；いずれの症例でも陽性所見は観察されなかった。

(6) 腺癌；高分化型腺癌では15例中6例で腺腔様構造部の内腔側細胞膜に陽性所見が認められた（図21D）。低分化型腺癌では12例中3例で腫瘍細胞の細胞膜および分泌顆粒限界膜に陽性像が観察された（図21E）。

考 察

I. TMK-1 に対する mAb20D11 の反応性

TMK-1 は mAb20D11 に対して細胞膜上に 300 kD 以上の3種類の抗原物質を有していた。このことは後述するように、腫瘍化に伴う抗原分子の化学的修飾を mAb20D11 が直接的に検出できる可能性を示しているものと考えられた。

II. 胃と肺の正常と腫瘍組織および培養細胞株に対する mAb20D11 の反応性について

特定の組織から発生した腫瘍が腫瘍独自の分化を示し、必ずしも母組織の形質を有しないことや、様々な腫瘍組織が“腫瘍化”することによって幼若化、同一化傾向を示すことは一般によく知られた事実である²⁾。このことは、種々のヒト腫瘍組織を免疫原として作製されたモノクローナル抗体や抗血清が、それぞれの腫瘍の原発組織においてのみならず、他の組織の免疫組織化学的研究にも応用されている理由の1つにほかならない^{1,2,6,9)}。また、胃、肺、唾液腺、乳腺、汗腺、涙腺など、全身の腺組織において、組織形態学的に極めて類似した腫瘍組織が発生することが知られており、それらが多くの腫瘍マーカーに対して同様の反応を呈することも報告されている^{6,9)}。本研究においても、胃癌組織由来の培養細胞株から得られた

表12 唾液腺腫瘍組織における mAb20D11, EMA, CEA の反応性

tissue	20D11	EMA	CEA
adenomas			
pleomorphic adenoma			
duct-like portion	50/50	21/32	8/32
trabecular portion	10/30	0/18	0/18
solid portion	8/37	0/22	0/22
myxoid portion	9/35	0/21	0/21
chondroid portion	1/15	0/12	0/12
adenomas			
adenolymphoma	25/25	8/20	0/20
other types	4/14	3/14	0/14
mucoepidermoid tumor			
mucus producing cell	9/10	5/10	2/10
epidermoid cell	8/10	4/10	2/10
intermediate cell	6/9	2/9	0/9
carcinomas			
adenoid cystic carcinoma			
true duct	22/22	12/22	0/22
pseudocyst	0/22	0/22	0/22
solid portion	0/22	0/22	0/22
adenocarcinomas			
well differentiated	13/15	11/15	6/15
poorly differentiated	10/12	9/12	3/12

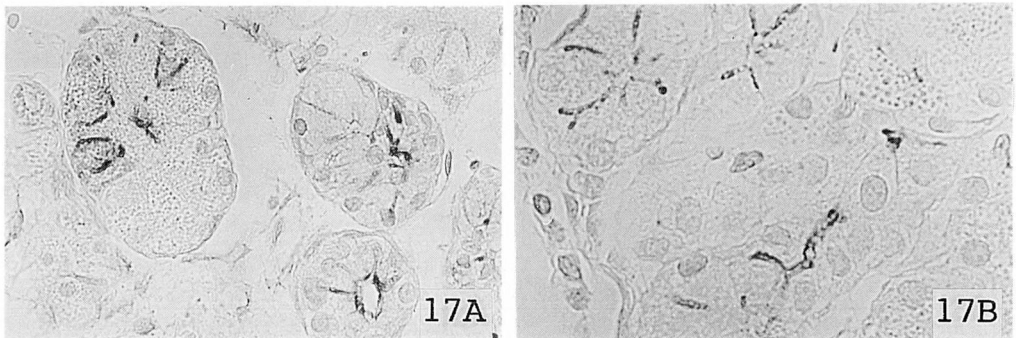


図17 正常顎下腺組織における EMA と CEA の免疫染色像

EMA は腺房細胞間細管および全ての導管の内腔側細胞膜に陽性を示した (A)。CEA は腺房細胞間細管や介在部導管の内腔側細胞膜に陽性であった (B)。

A: ×150, B: ×200

mAb20D11 によって認識される抗原物質が、胃のみならず肺、顎下腺の導管系上皮組織にも胎生期より出現し、これら臓器から発生する腫瘍組織においても発現することが示された。腫瘍関連抗原の発現様相には、 α -fetoprotein^{10,11)} のように胎児期の肝に発現しながら成人では発現せず、腫瘍組織において発現する場

合や、CEA のように胎児や成人の正常組織にも存在し、腫瘍組織において量的に増大する場合がある。胃、肺は、いずれも胎生期には腺上皮細胞により構成された未熟な管腔形成を示すが、mAb20D11 はそれらの幼若組織においては特定の細胞に局限することなく、管腔全体の上皮細胞の内腔側細胞膜に反応性を有

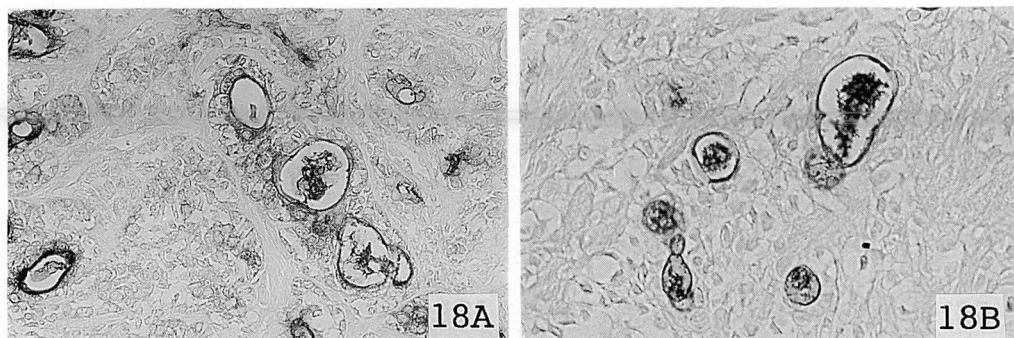


図18 多形性腺腫における EMA と CEA の免疫染色像

EMA, CEA はともに導管様構造部の内腔側細胞膜のみに陽性を呈した (A, B). A: $\times 150$, B: $\times 200$

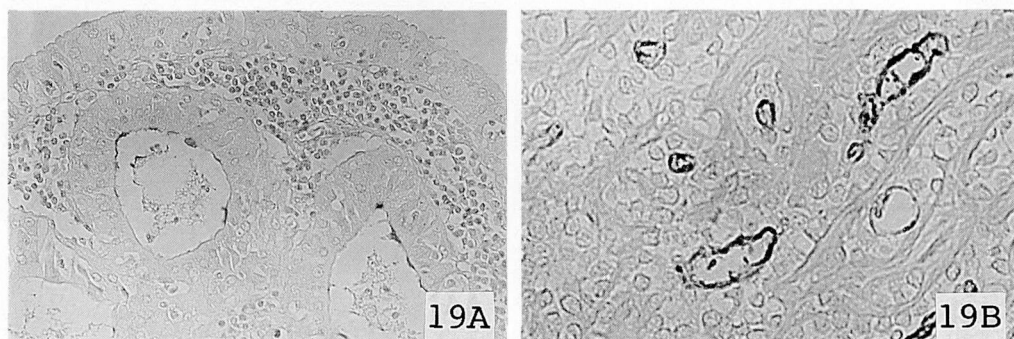


図19 単形性腺腫における EMA の免疫染色像

腺リンパ腫では腺腔様構造部の内腔側細胞膜が陽性を呈した (A). 基底細胞腺腫では導管様構造部の内腔側細胞膜が陽性を呈した (B). A: $\times 150$, B: $\times 200$

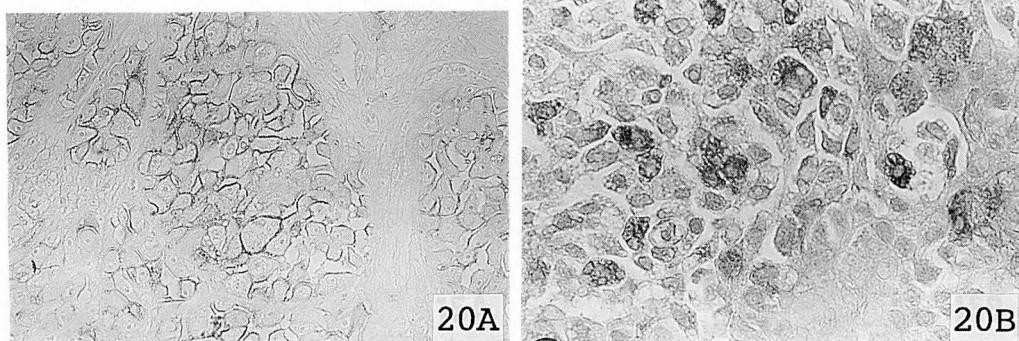


図20 粘表皮腫における EMA の免疫染色像

粘液産生細胞, 表皮様細胞 (A), 中間細胞 (B) の細胞膜が陽性を呈した例. A, B: $\times 200$

していた。さらに組織の成熟に伴い、胃では壁細胞、肺ではⅡ型肺胞上皮に反応部位が局限することが示された。一方、胎児に類似した組織構築を示すこれらの臓器の悪性腫瘍組織において、胎児組織と同様に、腺腔様構造部や肺胞様腔を構成する全実質細胞に陽性所

見を呈することも明らかとなった。したがって、腫瘍組織において mAb20D11 に反応する抗原分子の発現様相は CEA のように量的変化を伴うものであることが伺われた。

また、胃や肺の腫瘍組織および胃癌由来培養細胞株

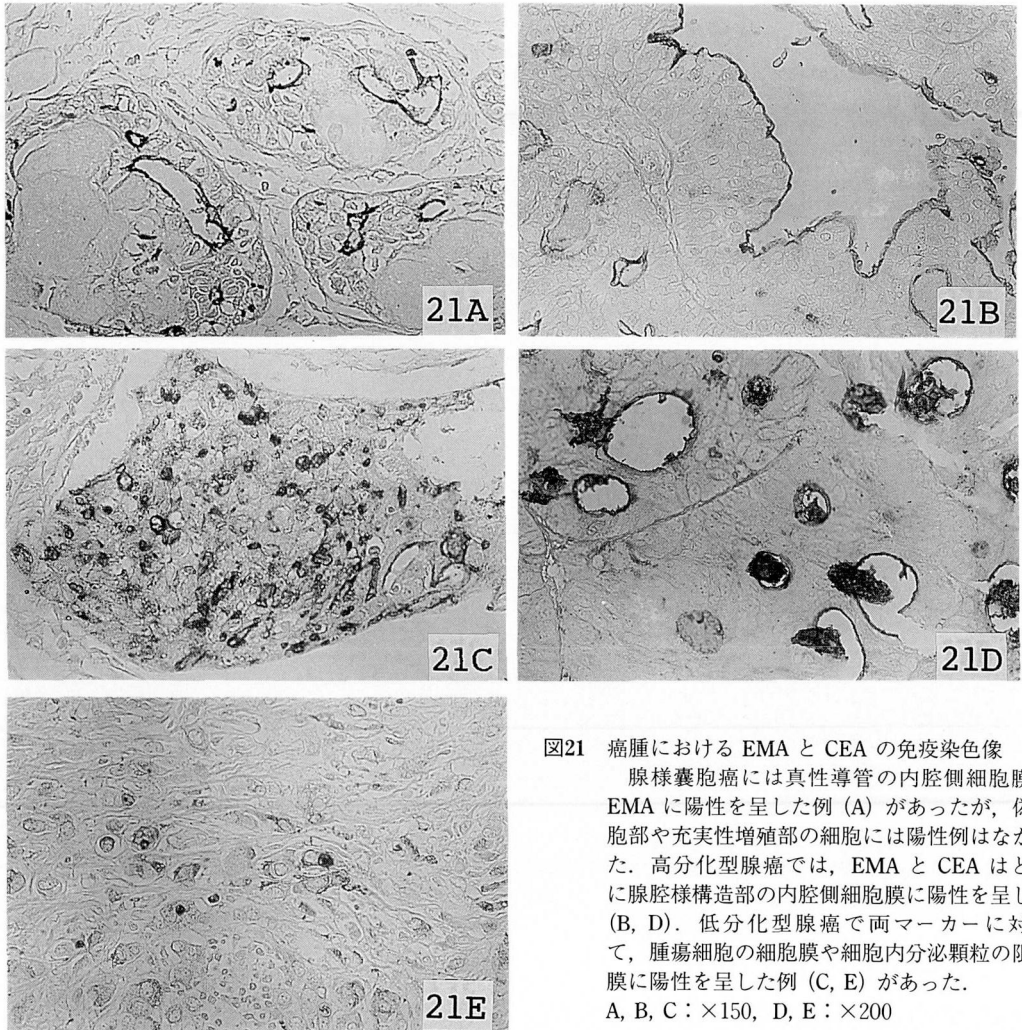


図21 癌腫における EMA と CEA の免疫染色像

腺様嚢胞癌には真性導管の内腔側細胞膜が EMA に陽性を呈した例 (A) があったが、偽嚢胞部や充実性増殖部の細胞には陽性例はなかった。高分化型腺癌では、EMA と CEA はともに腺腔様構造部の内腔側細胞膜に陽性を呈した (B, D)。低分化型腺癌で両マーカーに対して、腫瘍細胞の細胞膜や細胞内分泌顆粒の限界膜に陽性を呈した例 (C, E) があった。

A, B, C : $\times 150$, D, E : $\times 200$

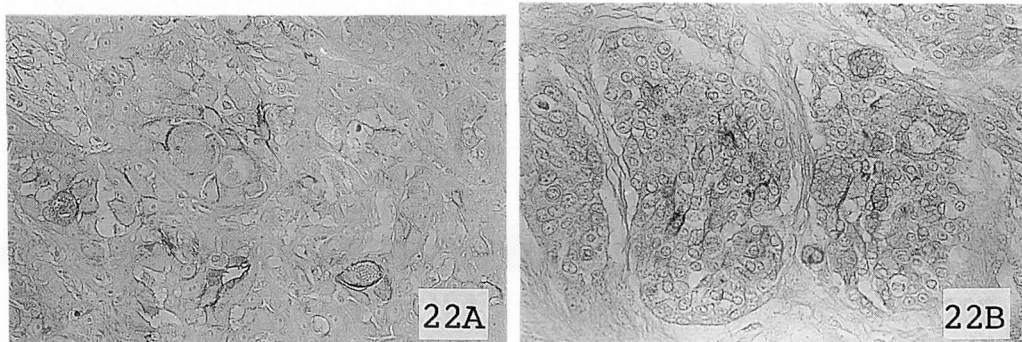


図22 粘表皮腫における CEA の免疫染色像

粘液産生細胞 (A) と表皮様細胞 (B) の細胞膜が陽性を呈した例。A, B : $\times 200$

は、正常組織で観察された 62 kD の抗原分子を有することなく、300 kD 以上の比較的大きい分子量の抗原を有することが示された。mAb20D11 に対して同一の epitope を有する抗原物質が複数の分子量を示すことが、抗原タンパクの多糖類による修飾²⁹⁾によるものか、あるいは RNA の splicing³⁰⁾によるものかは、検索の結果からは断定しえないが、mAb20D11 に反応性を有する抗原分子が、“腫瘍化”の過程で、単に量的に増大するのみならず、質的にも変化することから、本抗体を腫瘍の血清学的診断や生物学的悪性度の判定にも応用できる可能性が示唆された。

Ⅲ. 正常顎下腺と唾液腺腫瘍組織に対する mAb20D11 の反応性について

mAb20D11 の正常顎下腺組織における反応部位は線条部導管の内腔側細胞膜であるが、種々の腫瘍関連抗原を用いた報告の中に線条部導管と特異的な反応性を有するものは見られない。また、上皮細胞膜上の抗原を認識しながら、筋上皮様ないしは間葉様分化を示す細胞成分にも陽性を呈したことから、後述するように、各種唾液腺腫瘍組織の発生過程の解析に有用なマーカーとして応用できると考えられた。

Ⅳ. 正常顎下腺と唾液腺腫瘍に対する mAb20D11, EMA と CEA の反応性について

ヒト唾液腺腫瘍に対する免疫組織化学的検索の多くは、ケラチン^{5,31)}、S-100 タンパク^{32,33)}、ピメンチン³²⁾、アクチン³²⁾、などの細胞骨格を構成するタンパクや、アミラーゼ^{18,19)}、ラクtofフェリン³⁴⁾などの機能タンパクについて行なわれている。それらの研究の多くは、正常唾液腺組織を構成する腺房細胞、筋上皮細胞、導管上皮細胞に固有のタンパク質が唾液腺腫瘍組織を構成するいずれの細胞に含まれるかを調べ、その唾液腺腫瘍が正常唾液腺組織のどの部位から発生したかを推測することを目的としている。しかし、唾液腺腫瘍に関して、腺腫や腺癌に特有の分泌上皮細胞の細胞膜に対する抗体を用いた免疫組織化学的検索はほとんど行なわれていない。

本研究において著者は、mAb20D11 が胃および肺組織の分泌上皮の細胞膜に特異的な反応性を有することに着目し、胎児および成人の顎下腺組織および唾液腺腫瘍組織におけるその反応性を検索した。同時に、やはり腺上皮細胞の細胞膜に反応性を有することの知られる EMA と CEA の唾液腺腫瘍組織における反応性についても検索した。その結果、mAb20D11 は胎生 6 カ月から 8 カ月までの顎下腺組織においては原始導管を構成する全ての裏層上皮の内腔側細胞膜に反応性を

有することが判明した。しかし、胎生 8 カ月以後、本抗体の反応性には変化が見られ、線条部導管細胞の内腔側細胞膜のみに陽性所見が観察された。山原¹⁴⁾の報告によれば胎児顎下腺における EMA と CEA の発現時期はそれぞれ胎生 8 カ月と 7 カ月である。これに対して mAb20D11 に反応性を有する抗原物質の発現は、1 ないし 2 カ月であることが明らかとなった。

多形性腺腫において EMA, CEA はともに導管様構造部以外には陽性所見を欠いており、その点で浜川³⁴⁾らの報告と一致していた。これに対して mAb20D11 は、本腫瘍の上皮細胞部のみならず、間葉様分化傾向を示す粘液腫様部や軟骨様部を構成する実質細胞にもそれぞれ 31.8%, 6.7% の検索例で陽性を示した。すなわち、正常顎下腺組織の線条部導管、多形性腺腫の腺腔裏層細胞および腫瘍性筋上皮細胞において、本抗体が共通の epitope を認識することより、多形性腺腫の発生活源を解析する有用なマーカーになりうる可能性を示しているものと考えられた。

mAb20D11, EMA および CEA の唾液腺悪性腫瘍における反応性を比較すると、mAb20D11 は他の 2 つの抗体に対して、明らかに高い発現率を呈した。特に腺様嚢胞癌では、EMA と CEA の発現率がそれぞれ 54.5% と 0% であるのに対して mAb20D11 は検索した全例に陽性所見を呈した。粘表皮腫でも EMA と CEA がそれぞれ 50.0% と 20.0% の発現率を示したのに対して、mAb20D11 は 84.2% の症例で陽性であった。腺腔形成が著明な比較的高分化型腺癌では mAb20D11, EMA と CEA はそれぞれ 86.7%, 73.3% および 40.0% の症例で腺腔様構造部の内腔側細胞膜に陽性であり、低分化型腺癌では 83.3%, 75.0% および 25.0% の症例で腫瘍細胞の細胞膜および分泌顆粒限界膜に陽性であった。したがって、mAb20D11, EMA および CEA はいずれも正常組織から腫瘍組織へと量的変動を伴う抗原であることが伺われた。また、mAb20D11 の認識する抗原は胎児と成人の顎下腺および唾液腺腫瘍組織広く存在し、その局在性から、細胞の分泌機能に深く関与することが示唆された。また、唾液腺の高分化型腺癌における発現様相は、胃や肺の胎児組織ならびに高分化型腺癌における発現様相と形態的に類似する傾向を示していた。したがって、mAb20D11 が唾液腺腫瘍においても癌組織と胎児組織に共通する epitope を認識する性格を有していることが推測され、各種唾液腺腫瘍組織の発生過程の解析に有用なマーカーとして利用できると考えられた。

結 論

以上の結果を総合すると、mAb20D11 に対する抗原

物質が、胃、肺および唾液腺組織の胎児と成人の正常および腫瘍組織において特異な分布様相を呈する事実から、本抗体が腫瘍性・胎児性の抗原を認識することが推察され、腺系組織における腫瘍の発生過程の解析に有用なマーカーとなるものと考えられた。さらに、胃癌、肺癌での本抗体に対する抗原物質に正常組織と比較して高分子量化が認められることから、本抗体をこれら臓器における腫瘍の血清学的診断や生物学的悪性度の判定に利用できる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究に際し、懇切なる御助言、御校閲を賜った広島大学歯学部口腔病理学講座二階宏昌教授、口腔細菌学講座杉中秀壽教授ならびに広島大学医学部病理学第一講座田原榮一教授に衷心より謝意を表します。また、本学口腔外科学第二講座下里常弘前教授に感謝し、さらに本論文の作成に際して、懇篤なる御指導ならびに御校閲賜りました広島大学歯学部口腔外科学第二講座石川武憲現教授に厚く謝意を表します。また、本研究において多大なる御助言を戴いた広島大学医学部病理学第一講座横崎 宏講師、歯学部口腔外科学第二講座原田 直博士ならびに口腔外科学第二講座教室員各位に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 漆崎一朗, 服部 信: 腫瘍マーカー, 医学書院, 東京, 1-6, 1985.
- 2) 渡辺慶一, 中根一穂: 酵素抗体法, 学際企画, 東京, 230-250, 1985.
- 3) Ochiai, A., Yokozaki, H., Kyo, E., Hozumi, T. and Tahara, E.: A monoclonal antibody reacting with various human carcinomas and fetal colon and esophagus. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 76, 915-918, 1985.
- 4) Moor, B.W.: A soluble protein characteristic of nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 19, 739-744, 1965.
- 5) Geiger, S., Geiger, B., Leitner, O. and Marshak, G.: Cytokeratin polypeptides expression in different epithelial elements of human salivary glands. *Virchows Arch. A* 410, 403-414, 1987.
- 6) Yamahara, M., Fujito, T., Ishikawa, T., Shimamoto, T., Yokozaki, H., Yasui, W. and Tahara, E.: Phenotypic expression of human epidermal growth factor in foetal submandibular gland and pleomorphic adenoma of salivary gland. *Virchows Arch. A* 412, 301-306, 1988.
- 7) Gold, P. and Freedman, S.O.: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* 121, 439-462, 1965.

- 8) Gold, P. and Freedman, S.O.: Specific carcinoembryonic antigens of human digestive system. *J. Exp. Med.* 122, 467-481, 1965.
- 9) Yokozaki, H. (1986): Epithelial phenotypic expression of human foetal gastrointestinal mucosa: an immunohistochemical analysis. *Hiroshima J. Med. Sci.* 35, 3, 207-222, 1986.
- 10) Bergstrnd, C.G. and Czar, B.: Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 8, 174-176, 1956.
- 11) Abelev, G.I., Perova, S.D., Khramkova, N.I., Postnikova, Z.A. and Irlin, I.S.: Production of embryonal α -globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1, 174-180, 1963.
- 12) Magnani, J., Nilsson, B., Brockhaus, M., Zopf, D., Steplewski, Z., Koprowski, H. and Ginsburg, V.: A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. *J. Biol. Chem.* 257, 17365-14369, 1982.
- 13) Herlyn, M., Sears, H., Steplewski, Z. and Koprowski, H.: Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen. I. presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric and pancreatic carcinoma. *J. Clin. Immunol.* 2, 135-140, 1982.
- 14) 山原幹正: ヒト胎児顎下腺および唾液腺多形性腺腫の形質発現に関する免疫組織化学的検討. 広島歯誌, 20, 55-69, 1988.
- 15) 小川郁子, 高田 隆, 二階宏昌, 小倉睦美, 伊集院直邦, 伊東博司: 唾液腺腫瘍の免疫組織化学的研究. II. 各種良性腫瘍における分泌上皮性マーカーの局在について. 歯基礎誌 26, 1190-1199, 1984.
- 16) 高田 隆, 小川郁子, 二階宏昌, 小倉睦美, 伊集院直邦, 伊東博司: 唾液腺腫瘍の免疫組織化学的研究. III. 各種悪性腫瘍における分泌上皮性マーカーの局在について. 歯基礎誌 27, 611-620, 1985.
- 17) Ochiai, A., Yasui, W. and Tahara, E.: Growth promoting effect of gastrin on human gastric carcinoma cell line. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 76, 1064-1071, 1985.
- 18) Yokozaki, H., Kyo, E., Ochiai, A., Ito, M., Tabuchi, J. and Tahara, E.: A monoclonal antibody capable of detecting new differentiation antigen of the stomach. *Int. J. Cancer* 50, 523-527, 1992.
- 19) Sloane, J.P. and Ormerod, M.G.: Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer* 47, 1786-1795, 1981.
- 20) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined spe-

- cificity. *Nature* 256, 495-497, 1975.
- 21) Köhler, G. and Milstein, C.: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6, 511-519, 1976.
 - 22) Nakane, P.K. and Pierce, G.G.: Enzyme labeled antibody: preparation and application for localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14, 929-931, 1966.
 - 23) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76, 4350-4354, 1979.
 - 24) McLean, I.W. and Nakane, P.K.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: a new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1077-1083, 1974.
 - 25) Mayahara, H., Hirano, H., Saito, T. and Ogawa, K.: The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase). *Histochem.* 11, 88-96, 1967.
 - 26) Nakane, P.K. and Kawaoi, A.: Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084-1091, 1974.
 - 27) Motoyama, T., Hojo, H. and Watanabe, H.: Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol. Jpn.* 36, 65-83, 1986.
 - 28) 北條晴人: ヒト胃癌培養細胞株の樹立とその形態学的特性. 新潟医学会誌 91, 11, 737-753, 1977.
 - 29) Busu, A., Murthy, U., Rodeck, U., Herlyn, M., Mattes, L. and Das, M.: Presence of tumor-associated antigens in epidermal growth factor receptors from different human carcinomas. *Cancer Res.* 47, 2531-2536, 1987.
 - 30) Gendler, S.J., Burchell, J.M., Duhig, T., Larnport, D., White, R., Parker, M. and Taylor-Papadimitriou, J.: Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84, 6060-6064, 1987.
 - 31) Born, I.A., Sshwechheimer, K., Maier, H. and Otto, H.F.: Cytokeratin expression in normal salivary glands and in cystadenolymphoma demonstrated by monoclonal antibodies against selective cytokeratin polypeptides. *Virchows Arch. A* 411, 583-589, 1987.
 - 32) 二階宏昌, 小川郁子, 高田 隆, 伊集院直邦: 唾液腺腫瘍の免疫組織化学—腫瘍性筋上皮の染色所見を中心に—. 病理と臨床. 別冊 7, 5, 574-581, 1989.
 - 33) Hara, K., Ito, M., Takeuchi, J., Iijima, S., Endo, t. and Hidaka, H.: Distribution of S-100b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. *Virchows Arch. A* 401, 237-249, 1983.
 - 34) 浜川裕之, 土井 正, 森 恵造, 谷岡博昭: ヒト唾液腺腫瘍の免疫組織化学的研究. 日口外誌 32, 7, 1109-1120, 1986.