

ヒト子宮内膜および子宮内膜癌組織の 複合糖質に関する組織化学的研究

塩 沢 丹 里

信州大学医学部産科婦人科学教室

(主任: 福田 透教授)

Histochemical Study on Glycoconjugates in Human Endometrium and Endometrial Carcinoma

Tanri SHIOZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Toru FUKUTA)

A battery of immunohistochemical techniques were employed to detect glycoconjugates expressed in the human endometrial tissue. The specimens included 51 cases of normal and 13 of hyperplastic endometrium, and 46 cases of endometrial adenocarcinoma. Histochemical probes applied consisted of monoclonal antibodies (anti-keratan sulfate, anti-chondroitin sulfate and anti-heparan sulfate), 9 lectins and 5 monoclonal antibodies for blood type determinants and related antigens (A, B, H, Lewis^a and Lewis^b). In addition, the effect of neuraminidase digestion on these probes was also examined. Anti-keratan sulfate antibody, neuraminidase-Griffonia simplicifolia agglutinin-I (B₄) and wheat germ agglutinin showed relatively strong and consistent affinities to the glandular epithelia in normal as well as hyperplastic endometrium and carcinoma cells. Ulex europaeus agglutinin-I and neuraminidase-peanut agglutinin revealed relatively selective affinities to the carcinoma tissues. Blood group antigens and related antigens were not demonstrated in the normal endometrium, but were found in the carcinoma tissue. Molecular weight of the anti-keratan sulfate antibody reactive antigen was estimated at 200,000 from SDS-PAGE analysis. *Shinshu Med. J.*, 38: 89-106, 1990

(Received for publication October 17, 1989)

Key words: endometrium, endometrial carcinoma, lectin, keratan sulfate, blood group determinant

子宮内膜, 子宮内膜癌, レクチン, ケラタン硫酸, 血液型物質

I 緒 言

近年わが国における子宮体癌の発生率は、子宮頸癌の発生率の低下に反して増加傾向を示しつつあり¹⁾, その臨床的意義の重要性が指摘されている。子宮体癌の診断は、おもに子宮内膜細胞診および内膜生検によ

って一応確立されているが、体癌が高齢者や未婚者に多く、組織あるいは細胞材料の採取の際に各種の問題があり、時には検体の採取が困難な症例のあることから、早急な血清診断系の確立が待たれている。

近年の分子生物学的進歩は多種のモノクローナル抗体の作製を可能にし、卵巣癌における CA125²⁾ のよう

に臨床的にも非常に有用な抗体がすでに開発されている。いうまでもなく、優れた抗体を作製するためには目的となるべき抗原の検索と設定が重要な課題で、今回の研究は子宮内膜および内膜癌組織における特異的な糖鎖抗原を組織化学的に探索し、実地臨床への応用を検討することを目的とした。

生物細胞の細胞膜あるいは細胞質には、糖蛋白、あるいは、糖脂質などの複合糖鎖が存在することが知られており、それらの糖鎖構造は分化などの細胞の形質の変化に伴って多様な変化をすることが指摘されている³⁾。今回の研究では細胞に存在する複合糖鎖とその変化に着目し、その変化を捉えるプローブとして、糖鎖末端の特定の糖残基を認識するレクチン9種と、それに加えて抗コンドロイチン硫酸、抗ケラタン硫酸、抗ヘパラン硫酸、抗A, B, H および抗Lewis^a, 抗Lewis^b モノクローナル抗体を選定した。以上のプローブを用いて、正常および悪性子宮内膜組織の免疫染色を行い、糖鎖構造の局在につき検索し、子宮内膜あるいは内膜癌特異的な抗原の有無につき検討した。さらに抗ケラタン硫酸抗体については、[SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下 SDS-PAGE と略）および Western-blotting 法を施行し、抗原分子量の測定を試みた。

II 材料と方法

A 免疫染色

1 子宮内膜組織：正常子宮内膜を子宮頸部上皮内癌あるいは子宮筋腫により単純子宮全摘を行った21症

例より採取した。これらの検体は組織像および最終月経などを参考として増殖期11例（増殖期初期3例、中期4例、後期4例）および分泌期10例（排卵期～分泌期初期4例、分泌期中期3例、分泌期後期3例）に分類した。内膜癌組織は内膜癌手術20例より採取、FIGOの組織分類⁴⁾により G1（高分化型）8例、G2（中程度分化型）7例、G3（低分化型）5例に大別した。

後述の各染色をまずこれら正常21例癌20例計41例について施行した。さらに興味深い染色結果の得られた3種の染色（抗ケラタン硫酸抗体染色、GS-I, UEA-I）については、これらの41例に加え、正常内膜30例（増殖期初期5例、中期5例、後期5例、排卵期～分泌期初期5例、分泌期中期5例、後期5例）、内膜癌26例（G1 10例、G2 11例、G3 5例）、嚢胞性腺性過形成（以下 CGH と略）5例、腺腫性過形成（以下 AH と略）8例を上記と同じく手術材料より追加選択して染色し、検討を行った。検体の組織型と血液型は Table 1 に記載した。

検体は採取後直ちに24時間10%磷酸緩衝ホルマリン（pH7.4）で固定後、パラフィン包埋し、3μm の連続切片を作成した。

2 抗体およびレクチン：今回の研究では一次抗体として、抗ケラタン硫酸モノクローナル抗体、抗コンドロイチン硫酸モノクローナル抗体（ΔDi-6S）、抗ヘパラン硫酸抗体の3種（いずれも生化学工業、東京）を選んだ。また血液型抗原の発現の検査には、抗A、抗B、抗Hモノクローナル抗体、抗Lewis^a および抗Lewis^b モノクローナル抗体（以上いずれも DAKO

Table 1 Blood types of specimens examined

	Normal endometrium		Endometrial carcinoma			CGH	AH
Blood types	PP	SP	Histological grading				
			G1	G2	G3		
A	8 (2)	5 (7)	3 (2)	3 (2)	0 (1)	2	3
B	1 (4)	0 (1)	2 (5)	0 (4)	3 (1)	1	2
H (0)	0 (6)	2 (7)	2 (1)	4 (5)	0 (2)	2	2
AB	2 (3)	3 (0)	1 (2)	0 (0)	2 (1)	0	1
Sum	11 (15)	10 (15)	8 (10)	7 (11)	5 (5)	5	8

Abbreviations used : PP ; proliferative phase, SP ; secretory phase, CGH ; cystic glandular hyperplasia, AH ; adenomatous hyperplasia. Numbers of cases in parentheses and numbers of cases in columns of CGH and AH indicate those added for studies of anti-keratan sulfate antibody, GS-I, and UEA-I.

Table 2 Lectins used, their sugar specificities and concentrations of lectins for staining

Lectins	Sugar specificities	Concentration
Griffonia simplicifolia agglutinin-I-B ₄ (GS-I)	α -D-Gal	20 μ l/ml
Ulex europaeus agglutinin-I (UEA-I)	α -L-Fuc	30 μ l/ml
Peanut agglutinin (PNA)	β -D-Gal	30 μ l/ml
Dolichos biflorus agglutinin (DBA)	α -D-GalNAc	10 μ l/ml
Soybean agglutinin (SBA)	α -D-GalNAc	10 μ l/ml
Wheat germ agglutinin (WGA)	β -D-GlcNAc	5 μ l/ml
Maclura pomifera agglutinin (MPA)	α -D-GalNAc	5 μ l/ml
Griffonia simplicifolia agglutinin-II (GS-II)	D-GlcNAc	10 μ l/ml
Limax flavus agglutinin (LFA)	NeuAc	20 μ l/ml

社, Santa Barbara, California, U.S.A.) を使用した。二次抗体としてはペルオキシダーゼ (HRP と略) 標識抗マウス IgG ウサギ抗体 (DAKO 社) を用いた。なお, 抗ケラタン硫酸抗体染色の場合は, 染色結果をケラタナーゼ (生化学工業) 消化を加えた時と加えない場合とで比較検討した。また, 抗コンドロイチン硫酸抗体染色の場合はコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業) 消化後に抗体を反応させた。

各染色の陽性コントロールとしては, 抗ケラタン硫酸抗体および抗コンドロイチン硫酸抗体染色の場合はヒト関節軟骨を用い, 抗血液型抗体染色の場合は血液型の判明している赤血球とした。また陰性コントロールとしては, 一次抗体に正常マウス血清を用いた。

レクチンは, E. Y. Laboratories (San Mateo, California, U.S.A.) の HRP 標識レクチンのうち, Griffonia simplicifolia agglutinin-I-B₄ (GS-I), Ulex europaeus agglutinin-I (UEA-I), Peanut agglutinin (PNA), Dolichos biflorus agglutinin (DBA), Soybean agglutinin (SBA), Wheat germ agglutinin (WGA), Maclura pomifera agglutinin (MPA), Griffonia simplicifolia agglutinin-II (GS-II), Limax flavus agglutinin (LFA) の 9 種を使用した。各レクチンの糖結合特異性および染色時の希釈濃度は Table 2 のごとくであり, これらのレクチンの糖結合特異性は表記した単糖あるいはオリゴ糖の添加による結合阻止試験で確認した。

3 ノイラミナーゼ消化: 糖鎖末端のシアル酸に隣接する糖鎖構造を調べるために, ノイラミナーゼ (ナカライケミカル, 京都) 消化を上記の抗ケラタン硫酸抗体, 抗コンドロイチン硫酸抗体染色およびレクチン染色に行い, 消化を加えたものと加えないものと

の染色性の相違を連続切片により調べた。ノイラミナーゼ処理は内因性ペルオキシダーゼ活性阻止後に行い, 1 単位/ml で使用した。

4 染色法

a 脱パラフィン。

b 内因性ペルオキシダーゼ活性阻止のために 0.3% 過酸化水素加メタノールに 30 分間室温にて浸透。

c 各染色における 2 枚の連続切片のうちの 1 枚にノイラミナーゼ消化を 37°C で 4 時間施行。

d (1) 抗体による染色: 抗ケラタン硫酸抗体, 抗ヘパラン硫酸抗体および抗コンドロイチン硫酸抗体の場合は 1 μ l/ml に, また抗血液型抗体の場合には 20 μ l/ml に 0.1% 牛血清アルブミン (BSA) 加 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4, 0.05M NaCl を含む) で希釈し, 4°C で 12~16 時間 (over night) 反応させた。さらに二次抗体として HRP 標識したマウス抗 IgG 抗体を 10 μ l/ml の濃度で室温で 1 時間反応させた。抗ケラタン硫酸抗体染色の場合は内因性ペルオキシダーゼをブロック後, トリス-塩酸緩衝液で 2 単位/ml に希釈したケラタナーゼを 60 分間 37°C にて反応させ, 未反応のものと結果を比較した。また, 抗コンドロイチン硫酸抗体染色の場合は内因性ペルオキシダーゼブロック後, コンドロイチナーゼ ABC を トリス-塩酸緩衝液にて 0.2 単位/ml に希釈した後, 37°C で 60 分間反応させた。(2) レクチン染色: 前記 9 種のレクチンを 0.1% BSA 加 磷酸緩衝液 (pH 7.4, NaCl 0.2M を含む) にて希釈し, 4°C で 12~16 時間反応させた。

e 0.01% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, DAKO 社) 溶液 (0.005% H₂O₂ を含む) にて発色させた。

f 2% メチルグリーンまたはマイヤーのヘマトキ

シリコンにて核染後、脱水、透徹、封入。

B SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および Western blotting 法

1 材料および器具：増殖期および分泌期子宮内膜各1例、および分化型内膜癌2例より材料を手術直後に採取し、泳動時まで -70°C で保存した。

2 実験手順：基本的には Laemmli の方法⁵⁾に従った。すなわち、

a 検体を解凍後、湿重量の約5倍の0.1M PBSでホモジネートを作製した。

b 15,000rpmにて15分間超遠心した。

c 超遠心後の上清 30 μl に SDS30 μl を加え 80°C で5分間、SDS 化を施行、同じく分子量マーカー[BIO-RAD 社, high-molecular weight (45,000~200,000)]についても SDS 化を行った。また、同様の SDS 化をメルカプトエタノール (M.E と略) 添加 SDS で行い、下記の実験結果を比較した。

d 泳動用ゲル (TEFCO 社、東京) の8%ゲルを使用した。このレーンに SDS 化した検体および分子量マーカーを 10 μl ずつ滴下し、25mA で約60分電気泳動した。

e 泳動後のゲルにニトロセルロース膜 (BIO-RAD 社, Richmond, California, U.S.A.) を密着させ、Western-blotting には NOVABLOT (Pharmacia LKB Biotechnology 社, Uppsala, Sweden) を使用し、0.8mA/cm² で120分を行った。

f 転写後のニトロセルロース膜のレーンに Tris-Tween 緩衝液で500倍に希釈した抗ケラタン硫酸抗体を 4°C で18時間反応させ、Tris-Tween 緩衝液にて洗浄した後、二次抗体として Tris-Tween 緩衝液で100倍に希釈した HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体を室温で60分反応させた。

g 数回 Tris-Tween 緩衝液で洗浄後 DAB 溶液にて発色させる。

h 分子量マーカーをクマジ液によって染色し、相対移動度より抗体に反応する抗原の分子量を測定した。

III 結 果

A 免疫染色

各抗体およびレクチン染色の結果の概略は Table 3 に、また血液型物質の染色の結果は Table 4 に記した。結果の判定に関しては、まず各切片上で、正常内膜では腺上皮細胞と間質細胞ごとに、また悪性例では

癌細胞ごとに、陽性細胞が見られない時を(−)、陽性細胞が約1%以下の時を(±)、陽性細胞が約10%以下の時を(+), 10~50%の時を中等度陽性(++), 50%以上の時を強陽性(+++)とし、(+)以上の例を陽性例とした。ただし、Table 3 には各染色における全例をまとめた平均的な結果を、また、血液型物質染色の結果は各血液型ごとに陽性例数のみを記載した。

1 抗ケラタン硫酸抗体染色：正常子宮内膜において、増殖期ではおもに腺上皮細胞の管腔面 (apical surface, ap と略) と細胞質基底部にはほぼ全例で反応性を認めたが、細胞質全体が反応する例は見られなかった (Fig. 1a, 1b, 1c)。分泌期では初期には ap にのみ反応性を認めた (Fig. 2a, 2b, 2c) が、中期~後期にかけては、ap のみならず腺上皮細胞の細胞質 (cp と略) にも比較的強い反応性を認めた (Fig. 3a, 3b, 3c)。また、内膜基底層に存在する比較的類円形の腺腔と低立方状の腺上皮細胞をもつ腺はしばしば強染される傾向が見られた (Fig. 4a, 4b)。被蓋上皮にもまた分泌期、増殖期を問わず軽度の反応性がみられたが、とくに線毛細胞は線毛を中心によく反応する傾向を示した (Fig. 1a, 1b, 1c)。内膜間質細胞は一般的には反応性を示さなかったが、分泌期中期の浮腫状間質のごく一部分に軽度な彌漫性の反応性を認める例があった。CGH (Fig. 5a, 5b)、および AH は、ap を中心に軽度の反応性を呈した。

内膜癌症例については、癌細胞の cp, ap とともに反応性を示し、全体ではともに約80%の症例で反応を認めた (Fig. 6a, 6b)。染色される割合は分化度が高いほど高く、おもに ap を中心とした染色パターンを示し、部位によっては cp にも彌漫性に強い反応性を示すものも見られた。これに反して、低~未分化な例では一般的に反応性は低下傾向が見られ (Fig. 7a, 7b)、また、非常に未分化で一見肉腫様に増殖するような部分ではまったく反応がみられないことが多かった。反応性は、同一切片上の癌組織においても、部分によりかなり異なる傾向を示し、いわゆる heterogeneity がしばしば観察された。G1 あるいは G2 にはいわゆる腺棘細胞癌が含まれていたが、その中の扁平上皮部分は染色されなかった (Fig. 8a, 8b)。血管内皮細胞は染色されず、検体の血液型と、染色結果の間には特に相関を認めなかった。ノイラミニダーゼ消化およびケラタナーゼ消化による反応性の変化は正常例、過形成例、悪性例とも観察されなかった。

2 抗コンドロイチン硫酸抗体染色：今回検討した

検体において、間質や筋層の血管壁中層に軽度の陽性を認めたが (Fig. 9a, 9b), 正常子宮内膜の腺上皮細胞や間質細胞, あるいは癌細胞には反応性は認められなかった。またコンドロイチナーゼ ABC 消化をしなかった例では反応性はまったく認められなかった。

3 抗ヘパラン硫酸抗体染色: 今回の染色では正常悪性とも抗ヘパラン硫酸抗体に対する反応性は観察されなかった。

B レクチン染色

1 GS-I (B₄): ノイラミニダーゼ消化を加えないときには, GS-I 染色は正常腺上皮細胞, 悪性細胞, または被蓋上皮, 間質細胞を問わず, はほぼ全ての例で陰性であった。僅かに分泌期の2例の腺上皮細胞で cp に顆粒状に弱い反応性と ap に微弱な反応性を見るのみであった。しかし, ノイラミニダーゼ消化後では, 正常子宮内膜の増殖期 (Fig. 10a, 10b, 10c) の, ap ではほぼ全例に, cp でも約30%に陽性であった。cp における反応性は核上部を中心とした細顆粒状で, cp 陽性例は ap の反応性も強い傾向が見られた。分泌期ではやはり全例で ap は陽性で, cp でも約50%に陽性例を認め, その中でも最も強い染色例は分泌期中期～後期にかけて観察された (Fig. 11a, 11b, 11c)。切片内の各腺は均一な反応性を呈し, 内膜表層部あるいは基底部などとのあいだに明らかな反応性の差は見られなかった。被蓋上皮にはノイラミニダーゼ消化後にも反応性が見られたが, 内膜間質細胞はノイラミニダーゼ消化後も染色されなかった。CGH, AH ともやはりノイラミニダーゼ消化前では反応性は観察されなかったが, ノイラミニダーゼ消化後では CGH では腺上皮の cp に軽度の反応性をみとめ, AH は基本的に増殖期とよく似た ap を中心とした反応性を示した。

内膜癌症例でもノイラミニダーゼ消化の未施行例ではほとんど反応性がみられなかったが, ノイラミニダーゼ消化施行例では ap では約85%, cp では約65%に反応性を認めた。抗ケラタン硫酸抗体の場合と同様に G1 群に強い反応性を認め (Fig. 12a, 12b, 12c), G2, G3 と分化度が下がるにつれて反応性は低下した。抗ケラタン硫酸抗体染色の時と同様にいわゆる heterogeneity が観察されたが, ノイラミニダーゼ消化 GS-I 染色と抗ケラタン硫酸抗体染色の染色分布は異なっており, この2つの染色ともに強染される部分はほとんど見られなかった。G1 あるいは G2 には腺棘細胞癌が含まれていたが, 扁平上皮部分には反応性は観察されなかった。G3 例でも特に未分化な部分では

まったく反応性を認めないことが多かった。組織型にかかわらず検体の血液型と染色結果には特に相関は認めなかった。血管内皮細胞は正常, 悪性ともノイラミニダーゼ消化後に反応性が観察された。

2 PNA: 正常子宮内膜では, 増殖期, 分泌期とも ap を中心に軽度の反応性がみられた。増殖期の方が分泌期より強い反応性がみられたが, 月経周期を通して cp 全体まで染まる例は見られなかった。全体的にはノイラミニダーゼによる影響は軽微であった (Fig. 13a, 13b, 13c)。また, 内膜間質細胞にも性周期に関連なく, 軽度の反応性を認めた。内膜癌では, ノイラミニダーゼ消化の未施行例では分化度の高い5例に ap を中心に軽度の反応性をみるのみであったが, 消化後は ap に約80%, また, cp にも陽性例の出現を見た (Fig. 14a, 14b, 14c)。分化度の高い癌の方がより強い反応性を呈する傾向があるが, しかし G2 に属する1例のみはノイラミニダーゼ消化により反応性がやや低下した。また, 血管内皮細胞もノイラミニダーゼ消化後に反応性を認め, 抗ケラタン硫酸抗体染色で強染される部分が, この染色で反応性が高かった。

血液型との間には明らかな相関を認めなかった。

3 LFA: 正常内膜ではいずれの時期においても全ての例で ap を中心に反応性を認めた (Fig. 15a, 15b, 15c, Fig. 16a, 16b, 16c)。cp の反応性は一般的には弱かったが, 分泌期の4例には cp に反応性を認めた。ノイラミニダーゼ消化によって組織の反応性は減弱したが, 分泌期のほうがノイラミニダーゼ消化による反応性の低下は軽度であった。

内膜癌でも ap を中心にはほぼ全例に陽性細胞を認めた。分化度の良い癌により強い反応性を認め, ap の強染例では cp にも顆粒状の反応性を認めることが多かった (Fig. 17a, 17b, 17c)。充実性に発育する分化度の低い癌は ap, cp とも反応性が低下した。

血管内皮細胞あるいは赤血球の表面にも反応性を認め, 2例では間質細胞にも反応性がみられた。ノイラミニダーゼ消化によって上記の癌細胞, 間質細胞, 血管内皮細胞, 赤血球の反応性はほとんど消失した。

4 UEA-I: 正常子宮内膜では, O型症例の人の増殖期初期の ap のみに例外的に一部の腺上皮に軽度の反応性がみられたが (Fig. 18a, 18b), その他は ap, cp ともすべて陰性であった。ただし被蓋上皮は, 分泌期後期に軽度の反応を示した。内膜間質細胞は染色されなかった。

内膜癌では, 76%の症例が ap および cp において

陽性で、特に G1 あるいは G2 のグループで陽性率が高かった (Fig. 19a, 19b)。反応性と血液型の間には特別な相関はみられなかった。前述のノイラミダーゼ消化 GS-I 染色あるいはケラタン硫酸染色が ap を中心とした反応性を示すのに対して、UEA-I は核上部を中心とした cp 全体に彌慢性、顆粒状に反応性を示す傾向があった。また、同一切片上で癌組織の部位

ごとの反応性の差が、抗ケラタン硫酸抗体染色や GS-I 染色の場合に比べて少なく、癌組織が比較的均一に染色される傾向を示した。GCH および AH では、ap に軽微な反応性を認め、正常子宮内膜と内膜癌の中間的な結果を示した。

なお、正常子宮内膜、内膜癌ともに全例で血管内皮細胞が染色された。UEA-I 染色の結果は正常内膜、

Through Fig. 1 to 8, Fig. a shows histology and Fig. b and c illustrate the distribution of anti-keratan sulfate antibody reactive sites. Each set of figures were prepared from serial sections.

Fig. 1 The proliferative phase of normal endometrium.

a Hematoxylin-eosin (HE). $\times 42$

b Keratan sulfate-like substance is demonstrated in glandular epithelia as well as covering epithelia (arrow). $\times 42$

c Higher magnification of Fig. 1b. The apical surface (ap, long arrow) and basal cytoplasm of the epithelia react intensely. $\times 84$

Fig. 2 The early secretory phase of normal endometrium.

a HE $\times 42$

b The ap of the endometrial cells shows the reactivity. $\times 42$

c Higher magnification of Fig. 2b. Note that the reactivity was less intense compared with that of the epithelia of the proliferative phase. cf Fig. 1c. No cytoplasmic reactivity is observed. $\times 166$

Fig. 3 The middle to late secretory phase of the endometrium.

a HE $\times 38$

b Glandular epithelia react consistently. $\times 38$

c At the higher magnification of Fig. 3b, diffuse cytoplasmic reactivity is evident. $\times 128$

Fig. 4 The basal layer of the endometrium.

a HE $\times 42$

b Some of glands showed intense reactivity. $\times 42$

Fig. 5 Cystic glandular hyperplasia.

a HE $\times 32$

b The ap of hyperplastic epithelia shows intense reactivity. $\times 32$

Fig. 6 Well differentiated adenocarcinoma (G1).

a HE $\times 132$

b The ap of carcinoma cells reacts intensely. $\times 132$

Fig. 7 Poorly differentiated adenocarcinoma (G3).

a HE $\times 96$ Asterisks show carcinoma nests.

b Carcinoma nests (asterisks) show no reactivity. A faint reaction is observed in the stroma (arrow). $\times 96$

Fig. 8 Adenoacanthoma.

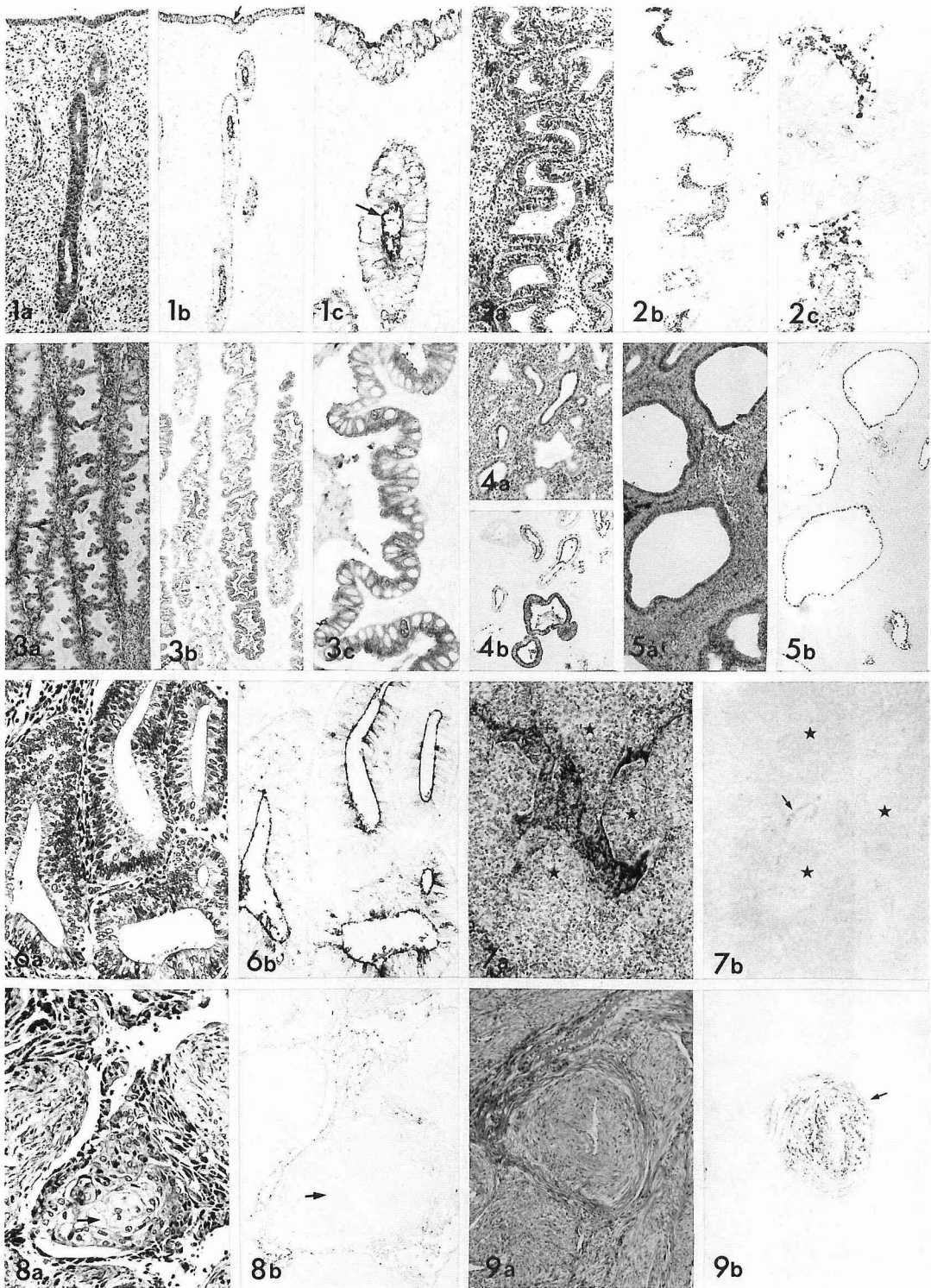
a HE $\times 128$ Note a squamous component (arrow).

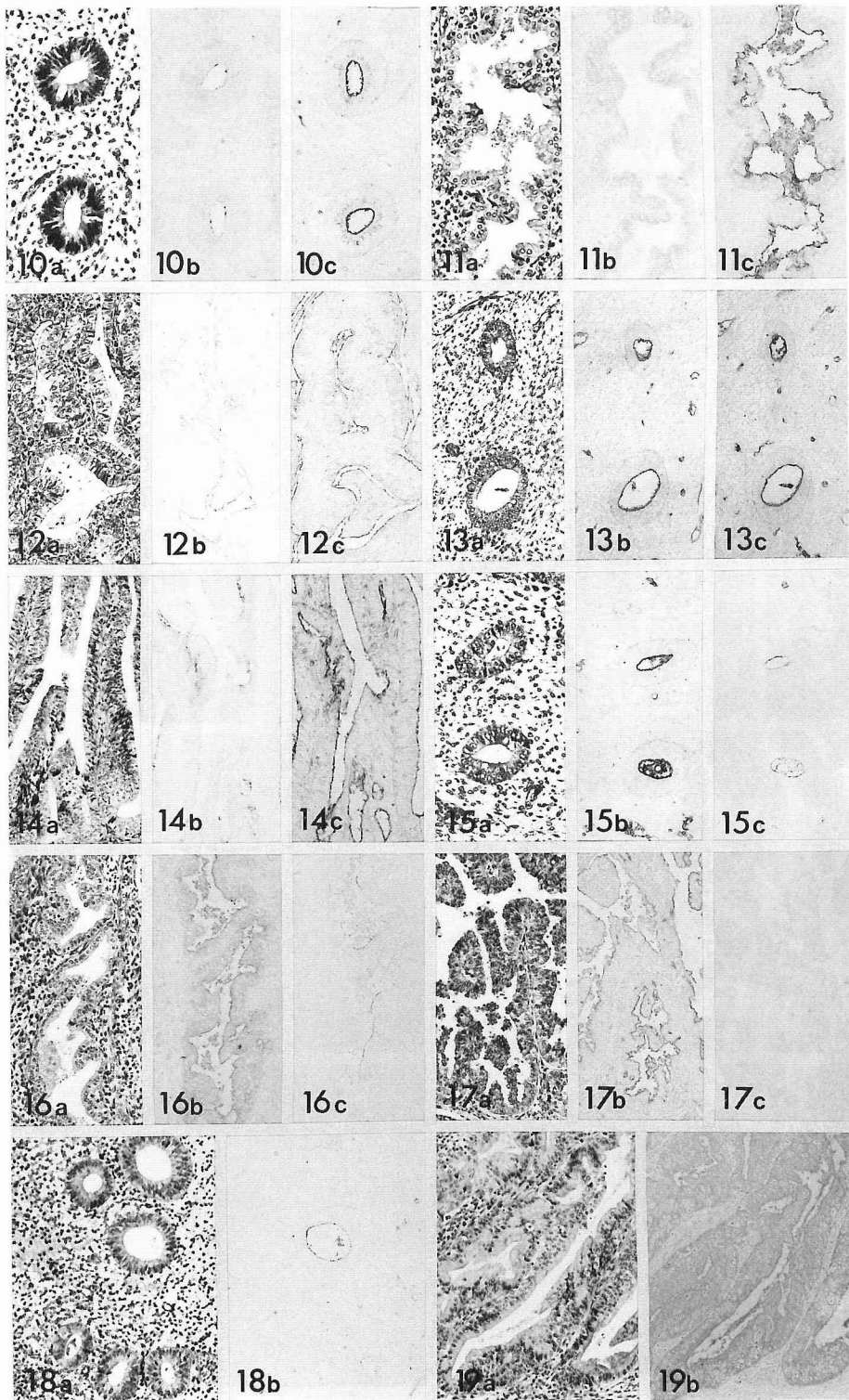
b Squamous cells (arrow) show no reactivity. $\times 128$

Fig. 9 Fig. 9a shows histology and Fig. 9b shows the distribution of anti-chondroitin sulfate antibody reactive sites.

a Myometrium. HE $\times 65$

b Vascular wall (arrow) shows the reactivity. $\times 65$





Through Fig. 10 to 12, Fig. a shows histology and Fig. b and c illustrate the distribution of GS-I (B₄) reactive sites. Each set of figures were prepared from serial sections.

Fig. 10 The proliferative phase.

- a HE ×74
- b GS-I reactivity is negligible before neuraminidase digestion. ×74
- c The neuraminidase digestion provides intense reactivity to the ap of the glandular epithelia. ×74

Fig. 11 The secretory phase.

- a HE ×38
- b Without neuraminidase digestion, GS-I reactivity is negligible. ×38
- c Prior neuraminidase digestion provides intense GS-I reactivity to the ap of the glandular epithelia. ×38

Fig. 12 Well differentiated adenocarcinoma (G1).

- a HE ×105
- b Without prior neuraminidase digestion, the carcinoma cells did not show the reactivity. ×105
- c Prior neuraminidase digestion yields intense reactivity. ×105

Through Fig. 13 to 14, Fig. a shows histology and Fig. b and c illustrate the distribution of PNA reactive sites.

Fig. 13 The proliferative phase.

- a HE ×80
- b The ap of the glandular epithelia reacts moderately. ×80
- c Prior neuraminidase digestion does not alter the reactivity significantly. ×80

Fig. 14 Well differentiated adenocarcinoma.

- a HE ×80
- b Without neuraminidase digestion, PNA reactivities are found only scatteredly. ×80
- c Neuraminidase digestion imparts intense reactivity to the ap of the carcinoma cells. ×80

Through Fig. 15 to 17, Fig. a shows histology and Fig. b and c illustrate the distribution of LFA reactive sites.

Fig. 15 The proliferative phase.

- a HE ×60
- b The ap of the glandular epithelia reacts intensely. ×60
- c Prior neuraminidase digestion removes most of the LFA reactivity. ×60

Fig. 16 The secretory phase.

- a HE ×60
- b The ap and cytoplasm (cp) show the reactivity. ×60
- c Prior neuraminidase digestion removes most of the LFA reactivity. ×60

Fig. 17 Well differentiated adenocarcinoma (G1).

- a HE ×60
- b The ap of the carcinoma cells reacts intensely. ×60
- c Prior neuraminidase digestion removes the reactivity completely. ×60

Through Fig. 18 to 19, Fig. a shows histology and Fig. b illustrates the distribution of UEA-I reactive sites.

Fig. 18 The proliferative phase of the endometrium.

- a HE ×60
- b Only some of the endometrial glands show a faint reactivity. ×60

Fig. 19 Well differentiated adenocarcinoma (G1).

- a HE ×60
- b The carcinoma cells react diffusely in their cp. ×60

過形成, 悪性を問わずノイラミニダーゼ消化による影響はみられなかった。

5 WGA: 正常子宮内膜における腺上皮細胞はやはり ap を中心に比較的強い反応性を示した。ap のみならず cp まで染まる例はやや分泌期の方が多い傾向を示した (Fig. 20a, 20b)。WGA で特徴的なのは内膜間質細胞が染色される点で (Fig. 20b), 反応性は性周期によって変化を示さなかった。ノイラミニダーゼ消化の影響は軽微であった。内膜癌では, ap に大多数の症例で陽性を認めた。また一部の例では cp にも陽性例が観察された。高分化型の癌により強い反応性が観察された (Fig. 21a, 21b)。また, ノイラミニ

ダーゼ消化によっても著明な変化は観察されなかった。

6 SBA: 正常子宮内膜では, 増殖期, 分泌期ともに ap を中心に反応性を認めたが, やや増殖期の方が強い反応性を示した (Fig. 22a, 22b)。ノイラミニダーゼ消化によって反応性がやや増強した。検体の血液型と反応性との相関はみられず, また, 間質細胞は染色されなかったが, A型の血管内皮細胞および赤血球は染色された。

内膜癌における SBA の反応性は全体的に低く, 分化度の高い群の ap を中心に軽度にも認めるのみであり (Fig. 23a, 23b), ノイラミニダーゼ消化による影響は観察されなかった。

Through Fig. 20 to 21, Fig. a shows histology and Fig. b illustrates the distribution of WGA reactive sites.

Fig. 20 The secretory phase.

a HE ×60

b The ap shows the WGA reactivity. Stromal cells also reveal the reactivity. ×60

Fig. 21 Well differentiated adenocarcinoma (G1).

a HE ×60

b The ap shows intense WGA reactivity. ×60

Through Fig. 22 to 23, Fig. a shows histology and Fig. b illustrates the distribution of SBA reactive sites.

Fig. 22 The proliferative phase.

a HE ×88

b The ap shows the SBA reactivity. ×88

Fig. 23 Moderately differentiated adenocarcinoma (G2).

a HE ×88

b The ap and debris in lumens react moderately. ×88

Through Fig. 24 to 27, Fig. a shows histology, Fig. b or c shows the distribution of histochemical reactivity.

Fig. 24 The secretory phase.

a HE ×16

b The ap as well as cp react moderately for DBA. ×16

Fig. 25 The secretory phase.

a HE ×60

b The ap reacts moderately for MPA. ×60

Fig. 26 Well differentiated adenocarcinoma (G1).

a HE ×60

b The ap shows intense anti-H reactivity. The cp also reacts rather weakly. ×60

Fig. 27 Well differentiated adenocarcinoma (G1).

a HE ×42

b The ap reacts intensely for the Lewis^a antigen. ×42

c The Lewis^b antigen, on the other hand, is demonstrated on the ap as well as in the cp. ×42

Fig. 28 illustrates the result of SDS-PAGE and Western-blotting of anti-keratan sulfate antibody reactive substances. C; carcinoma, P; proliferative phase, S; secretory phase, M.E; mercaptoethanol, B; bottom (origin), D; dye front. Reactive bands are only found in M.E untreated groups at approximately 200,000 molecular weight.

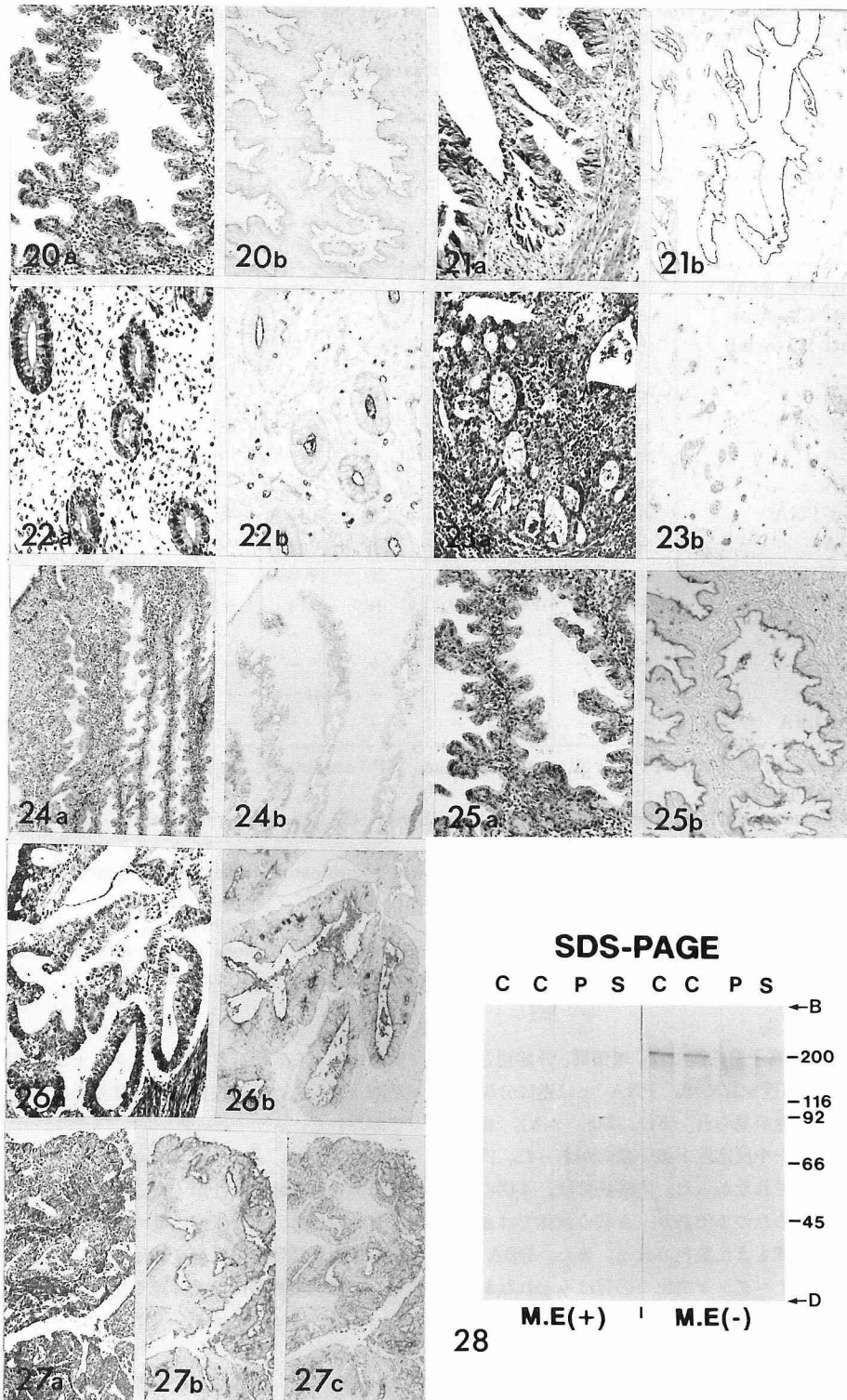


Table 3 Histochemical reactivities of normal endometrial tissues and carcinoma tissues examined

Sites stained

Probes used	Normal endometrium					Endometrial carcinoma					
	Glandular epithelium				Stromal cell	G1		G2		G3	
	PP		SP								
	ap	cp	ap	cp		ap	cp	ap	cp	ap	cp
Anti-KS-mcab	##	-~+	##	++	-	+~##	+	++	+	+	±
Anti-CS-mcab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-HS-mcab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GS-I	-~±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neu-GS-I	++	±	++	±	-	++~##	+	++~##	+	+	+
UEA-I*	±	-	-	-	-	+~##	+~##	++	++	+	+
PNA	++	-	+	-	±	±	-	±	-	-	-
Neu-PNA	++	-	+	-	±	++~##	+	+	±	+	-
DBA*	-	-	+~++	-	-	±	-	-	-	-	-
SBA*	++	-	++	-	±	+~##	±	+	-	-	-
WGA*	++~##	-	++~##	-	++	+	-	+	-	+	-
MPA*	±	-	+~++	-	-	-	-	-	-	-	-
GS-II*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LFA	##	-	##	-	-	++~##	+	+~##	+	+	-
Neu-LFA	±	-	+~++	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations used: PP; proliferative phase, SP; secretory phase, ap; apical surface, cp; cytoplasm

KS; keratan sulfate, mcab; monoclonal antibody, CS; chondroitin sulfate, HS; heparan sulfate, Neu; neuraminidase.

* indicates that neuraminidase digestion did not significantly alter lectin reactivities.

For lectins, see Table 2.

Reactivities of adenomatous hyperplasia and cystic glandular hyperplasia for anti-keratan sulfate antibody, GS-I and Neu-GS-I are comparable with those of the endometrium in the proliferative phase. Those tissues almost lacked a UEA-I reactivity.

7 DBA: 正常子宮内膜では、増殖期、分泌期とも ap を中心に反応性を認めた。PNA とは逆に分泌期により強い反応性が見られ (Fig. 24a, 24b), 血液型 A 型の症例にやや反応性が高い傾向があった。内膜間質細胞は染色されなかった。内膜癌では、4 例に軽度 ap 陽性を認めたのみであり、A 型の検体では血管内皮細胞と赤血球もまた染色された。また、DBA 反応性にはノイラミニダーゼ消化の影響はみられなかった。

8 MPA: このレクチンは、正常内膜ではおもに分泌期の ap に反応性を認め (Fig. 25a, 25b), また、性周期とは関係なく内膜間質細胞、血管内皮細胞にも

反応性がみられた。ノイラミニダーゼ消化により分泌期の ap と、血管内皮細胞には軽度の反応性の上昇が認められた。

内膜癌では、ノイラミニダーゼ消化の有無と反応性との関連は認められなかった。

9 GS-II: 正常子宮内膜では、性周期の如何にかかわらず、間質細胞に軽度の反応性を認めるのみであった。腺上皮細胞にはまったく反応性がみられなかった。また、ノイラミニダーゼ消化による変化も認められなかった。

内膜癌でも、組織分化度を問わず反応性を認めず、ノイラミニダーゼによる影響も受けなかった。

Table 4 Results obtained with anti-A, B, H, Lewis^a and Lewis^b antibodies

	Normal endometrium				Endometrial carcinoma			
Blood type	A	B	H	AB	A	B	H	AB
No. of cases	13	1	2	5	6	5	6	3
Antibodies								
Anti-A	1	0	1	1	1	0	0	0
Anti-B	0	0	0	0	0	0	0	0
Anti-H	0	0	1	0	3	0	2	1
Lewis ^a	0	0	0	0	1	1	4	2
Lewis ^b	2	0	0	0	2	3	6	2

Numbers in each column show positive cases.

C 血液型物質染色

1 A, B, H血液型: 正常子宮内膜では、いずれの検体でも、腺上皮細胞に血液型物質の発現は観察されなかった。

内膜癌では、A型の検体で抗A抗体染色陽性という例が1例あったのみで、一般には検体の血液型にかかわらずA, B型の血液型物質の発現は認められなかった。一方抗H抗体染色では、6例(30%)にH型物質の発現を認め(Fig. 26a, 26b)、陽性例のうちわけは、A型3例, H型2例, AB型1例であった。陽性例の多くはapを中心とした反応性であり、一部ではcpにも顆粒状の反応がみられた。また同一切片上でもかなりの heterogeneity が観察された。UEA-I 染色と比較した場合、UEA-I 染色の陽性率は抗H抗体染色よりも高いが、抗H染色で陽性の部分は UEA-I 染色も陽性であることから、抗H抗体反応性糖鎖を UEA-I が認識していると考えられた。

2 Lewis^a, Lewis^b 血液型: 正常内膜では検体の血液型および性周期、腺上皮、間質のいずれにも Lewis^a に対しての反応性はみられなかった。Lewis^b は腺上皮では増殖期1例、分泌期1例においてのみ反応性を認め、その染色性はcpに彌慢性に顆粒状になる傾向がみられた。また、性周期に関係なく約半数の例で間質細胞に反応を認めた。検体の血液型との間には明らかな相関は認められなかった。

内膜癌では20例中7例に Lewis^a 陽性を、また、13例に Lewis^b 陽性を認めた(Fig. 27a, 27b, 27c)。Lewis^a はapを中心とした反応性を示すのにたいし Lewis^b はcpに顆粒状となる傾向が観察された。このなかで両血液型物質がともに反応する例は6例あったが Lewis^b が陰性の例はすべて Lewis^a も陰性で

あった。また両抗体とも分化度の高い癌ほどより高い反応性を示した。Lewis^a の陽性例7例中4例、Lewis^b の陽性例13例中6例が血液型Hの検体であった。

D SDS-PAGE, Western-blotting 法

抗ケラタン硫酸抗体に反応する抗原分子量は M.E を加えない場合には、正常子宮内膜の分泌期内膜、内膜癌とも分子量約20万の1本のバンドが観察された。また M.E を加えて還元した場合には、正常子宮内膜、内膜癌ともに明らかなバンドは検出されなかった、(Fig. 28)。

IV 考 察

今回の一連の免疫染色によって、子宮内膜組織には種々の糖鎖が存在することが明らかになった。検出糖鎖は、内膜腺細胞に存在する糖鎖と間質細胞に存在する糖鎖に大別され、さらに前者は、普遍的に存在する糖鎖、月経周期に伴って量的に変動する糖鎖、腫瘍化に伴って消長する糖鎖に分類される。

内膜組織の中で、正常、悪性にかかわらず観察される反応性としては、まず、ケラタン硫酸関連糖鎖、ノイラミニダーゼで消化後に観察される GS-I 反応性糖鎖、さらには LFA, WGA, SBA などに反応する糖鎖が挙げられる。この中で、WGA, SBA, LFA については内膜を含む多くの臓器でこのレクチンを用いた研究成績が報告されている⁶⁾⁻¹²⁾。

抗ケラタン硫酸モノクローナル抗体によって同定される糖鎖は、すでにケラタン硫酸が存在することが知られている軟骨組織や角膜のような間葉系組織では組織化学的にも証明されているが¹³⁾、その他の組織では顆粒細胞腫にその存在が知られているだけである¹⁴⁾。

子宮内膜以外の上皮性組織ではまったく証明されないことから、内膜上皮に比較的特徴的な抗原である可能性がある。また、シアリダーゼ消化 GS-I 反応性についても、GS-I が α -Gal を認識しているとすれば、その末端にシアル酸は結合し得ないので¹⁵⁾、特異な糖鎖が存在する可能性がある。以下、この両者についての考察を少し詳細に記述する。

ケラタン硫酸は、c-6 の位置に硫酸基をもつ β -Gal-GlcNAc- の 2 糖の繰返し構造からなる 複合糖鎖の一種である。ケラタン硫酸は、コンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンとともにコア蛋白に共有結合している。さらにこのコア蛋白は結合蛋白部を介してヒアルロン酸に結合してプロテオグリカンとして軟骨あるいは角膜 など 間葉系組織の基質を形成している¹⁶⁾。今回著者は Caterson ら¹⁷⁾ の開発した抗体を使用した¹⁸⁾が、この抗体はヒトの関節軟骨をコンドロイチナーゼ ABC にて消化して得られたプロテオグリカンのコア蛋白を抗原として作製されたものである。ヒトの関節軟骨および角膜軟骨のケラタン硫酸、あるいはヒト以外の種のケラタン硫酸には交差反応性を示すものの、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸などのそのほかのグリコサミノグリカンとは反応性を示さないとされている。Mehmet ら¹⁸⁾は、本抗体は少なくとも c-6 位に硫酸基を待つ-4GlcNAc β 1-3Gal β 1- の反復性糖鎖が 6 糖以上ないと反応性を示さないこと、この糖鎖が 12 糖のときに最も強い反応性をもつこと、またこれらの糖鎖でも硫酸基がない場合にはまったく反応性を示さないと述べている。ケラタン硫酸における硫酸基の結合 頻度は本来の 間葉系組織 での場合、Gal の c-6 のみの場合と GlcNAc のみの場合、あるいは、双方の糖に同時に結合している場合などがあると言われており、内膜組織には少なくとも硫酸基を持つ 6 糖以上の反復性の糖鎖の存在の可能性が示唆される。著者ら¹⁹⁾は子宮内膜の腺上皮の apical surface に high iron diamine-alcian blue pH2.5 染色によりスルフォムチンの存在を証明しており、抗ケラタン硫酸抗体によって得られた結果と矛盾しない。また久布白²⁰⁾は内膜組織に硫酸化糖脂質の存在を証明しているが、今回の染色は通常のパラフィン切片であることから糖脂質上の糖鎖を認識しているとは考えにくい。ケラタン硫酸は、ケラタナーゼ (エンド β -ガラクトシダーゼ) により分解されるが、今回用いた生化学工業社のケラタナーゼは糖鎖に結合している硫酸基が多い時にはガラクトースを切断できない可能性が指摘さ

れているため²¹⁾、内膜におけるこの抗体に対する抗原がケラタン硫酸であることは否定できない。

SDS-PAGE, Western-blotting の結果よりメルカプトエタノールを加えない時の抗ケラタン硫酸抗体反応性糖鎖の分子量を検討したが、その結果は、検体数は少ないものの正常子宮内膜、内膜癌とも同様であった。この抗原が SDS 化により泳動されること、およびブロッティング後のニトロセルロース膜をクマジ液によって蛋白染色すると、抗ケラタン硫酸抗体と反応するバンドと同じ分子量のバンドが検出されることなどから、この抗原は分子量 20 万の糖蛋白であることが示唆された。ただし、SDS-PAGE により糖蛋白の分子量を測定する場合は、糖鎖の存在が測定値に影響を及ぼす場合があるため、今回の実験のみで断定的な結論を出すことができないのはもちろんである。本抗原の生化学的な意義については現在のところ不明であるが、内膜癌ではこの抗原量が増している可能性があり、正常者、あるいは内膜癌患者の血清中の抗原量の測定が今後の課題である。

一方、GS-I (B₄) は特に B 型の赤血球を凝集することから糖鎖末端の α -D-ガラクトースを認識すると言われており²²⁾、マウスの各臓器の基底膜²³⁾、あるいは卵膜²⁴⁾に対する親和性が報告されている。ヒト生殖器の分野では高分化型子宮頸部腺癌に反応性が認められている²⁵⁾ほかにはこのレクチンに関する報告はみられない。今回の成績では内膜組織ではノイラミニダーゼ消化後に GS-I に対する反応性が出現することが認められた。シアル酸は α ガラクトースとは結合しないので、ノイラミニダーゼ消化によって著明に反応性がよくなる現象は、GS-I 反応性糖残基が隣接糖鎖末端のシアル酸によって覆われている可能性が高いことを示唆している。内膜においては血液型物質は観察されておらず、内膜の染色結果が検体の血液型と無関係であったことから、GS-I 反応性糖鎖が血液型物質であることは考えにくい。ノイラミニダーゼ消化後に出現する GS-I 反応性については、Nakayama ら²⁶⁾によるヒト大腸杯細胞での報告がある。しかし、大腸における GS-I 反応性は血液型物質の A 型の分布とまったく一致しており、今回検出された糖鎖とは異なるものと考えられ、ケラタン硫酸反応性糖鎖と同様、内膜に特徴的な糖鎖である可能性がある。

月経周期に伴って変動するものとしては、増殖期に優位な PNA, SBA 反応性、分泌期に優位なケラタン硫酸関連物質, WGA, DBA, MPA 反応性がある。

PNA の正常内膜における反応性は Duncan ら⁶⁾, Bychkov と Toto⁷⁾ の報告と一致したが, SBA に関しては正常内膜ではほとんど染色されないという報告が多い⁶⁾⁻⁸⁾。著者はペルオキシダーゼ標識レクチンを使用した, 報告者はいずれも FITC 標識レクチンを使用しており, 方法の違いによるのかもしれない。なお, WGA, DBA に関しては, 相対的に分泌期によく染色されるという点で今回の結果は前述の Duncan ら⁶⁾ の結果と一致するものであった。また, 調べた限りでは内膜に関する MPA の報告はみられなかった。

内膜腺上皮細胞の悪性化に伴って反応性が発現するパターンをとるものには, UEA-I に対する反応性, シアリダーゼ消化後に出現する PNA 反応性があげられる。UEA-I は末端のフコースを認識するレクチンで²⁷⁾, 細胞の癌化に伴って反応性が現れる現象は以前から消化管の腺癌²⁸⁾で報告されていたが, 今回の成績により内膜癌でも同様の結果が観察された。また, UEA-I は血液型 H 型物質を認識するとも言われているが²⁷⁾, 今回行った抗 H 抗体による染色とは異なった反応性を示したため, UEA-I が認識している糖鎖は H 型物質とは異なったものも含まれていると考えられる。一方 PNA は T 抗原, すなわち Gal(1-3) GalNAc を認識する²⁹⁾とされ, この T 抗原は MN 抗原の前駆体としてのみではなく, 種々のムチン型糖鎖の基部にも存在し³⁰⁾, また, 以前より, 癌組織, あるいは癌患者の血清中に増加することが知られている³¹⁾。今回の成績では T 抗原は正常内膜および内膜癌に存在することを認め, さらに, 内膜癌においてはノイラミナーゼ消化により著明に反応性が高まる所見が観察された。この現象は内膜組織に T 抗原が存在するのみならず, 癌化に伴って糖鎖のシアリ化がおきている可能性が示唆される。内膜癌における UEA-I 反応性部分と PNA 反応性部分が互いに異なることに対し, 小笠原³²⁾はフコシダーゼ消化の結果から, 糖鎖末端に露出した T 抗原にフコースが結合したものではないとしている。これら 2 種の染色結果から内膜の癌化に伴う糖鎖の変化としては末端にフコースがあらわれるものと, 末端のシアリ化を伴った T 抗原が発現する場合と 2 つのパターンが存在する可能性が考えられた。

今回行った各染色での反応性はおもに腺上皮に対してであり, 間質細胞については WGA, および GS-II に軽度な反応性が観察されるのみで, 月経周期による明らかな変化は観察されなかった。間質細胞に関する

報告は Duncan ら⁶⁾, Bychkov と Toto⁷⁾, Soederstroem⁸⁾ もおもに WGA による反応性を報告しており, 今回の結果も彼らの報告に一致するものであった。

次に, 内膜組織に存在する糖鎖構造を調べるために行った, 血液型物質に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色の結果について考察を加える。子宮内膜腺上皮細胞は, 抗 A, 抗 B 抗血清を用いた Szulman³³⁾ により blood type antigen secretor と報告されている。今回のモノクローナル抗体を用いた染色の結果によれば正常子宮内膜に検体の血液型を問わず, 血液型物質の発現は観察されなかった。これは, 小笠原³²⁾, Inoue ら³⁴⁾ のモノクローナル抗体を用いた報告とおおむね一致するものと考えられる。

一方, 内膜癌においても大腸癌³⁵⁾と同様, 検体の血液型を問わず, H 型の発現が観察された。周知のごとく, H 型糖鎖は A または B 型の血液型物質糖鎖の前駆物質であり, H 型糖鎖の発現の機序に関しては様々な考察がなされている。内膜癌において, 正常内膜では A, B, H の血液型がまったく発現されていないことから, 乳癌などで言われている癌化に伴う不完全な糖転写酵素による糖鎖結合不全³⁶⁾は考えにくい。また, 末端のフコースを認識するとともに H 型物質を認識すると言われる UEA-I もやはり内膜癌にのみ陽性例が観察され, 上記の H 型血液型抗原の発現の可能性を裏付ける結果となった。しかし, UEA-I 陽性部位は抗 H 抗体陽性部にとどまらず, より広範な反応性を示したことから, いわゆる真の H 型糖鎖の形成とは別に癌化に伴い独立して, 末端にフコースをもった UEA-I 反応性糖鎖の増加がおり, 中には抗 H モノクローナル抗体と反応性をもつものが出現してきた可能性も否定できない。Lewis 抗原系に関しては今回の成績では正常内膜にはほとんどこの抗原が発現されなかったが, 内膜癌では特に Lewis^b 抗原系が発見されていることが観察された。井上³⁷⁾ はやはり Lewis^a が内膜での悪性変化に伴って出現すること, また Lewis^b はさらに癌胎児性抗原の性格を持っていると報告しているが, 今回の結果も井上らの報告に矛盾しないものであった。

V. 結 語

1 特定の糖鎖構造を認識するレクチンおよびモノクローナル抗体を用いて子宮内膜組織に免疫染色を行い, 子宮内膜に存在する, あるいはその癌化に伴って発現する複合糖質について組織化学的な検索を試みた。

2 組織化学的なプローブとして9種のレクチンとグリコサミノグリカンを認識する3種のモノクローナル抗体を使用した。また、抗血液型物質抗体として抗A, B, H, Lewis^a, Lewis^bモノクローナル抗体を用いた。さらに、各プローブの反応性に対するノイラミニダーゼ消化の効果を検討した。材料は正常内膜51例、内膜癌46例、過形成性内膜13例で、そのパラフィン切片を染色に供した。また、正常内膜2例および内膜癌2例の組織抽出液に対し、SDS-PAGE, Western-blottingを施行し、抗ケラタン硫酸抗体に反応する抗原分子量の測定を行った。

3 抗ケラタン硫酸抗体は正常内膜腺上皮および高分化型内膜癌に高い親和性を示したが、他種の抗グリコサミノグリカン抗体は上皮組織に親和性を示さなかった。レクチンでは、WGA, LFA, SBA, ノイラミニダーゼ消化 GS-I は正常内膜腺上皮、内膜癌の両者に親和性を示した。UEA-I, ノイラミニダーゼ消化 PNA は内膜の癌化に伴って親和性が出現し、一方、DBA, MPA は癌化に伴って親和性が低下した。月経周期では、PNA, SBA は増殖期腺上皮に、WGA, DBA, MPA は分泌期腺上皮に優位な親和性を示した。なお、WGA は内膜間質細胞に対しても親和性を

認めた。正常内膜では血液型物質の発現は観察されなかったが、内膜癌では、検体の血液型にかかわらず、H, Lewis^a, Lewis^bの発現を認めた。

4 SDS-PAGE, Western-blotting 法により抗ケラタン硫酸抗体に反応する抗原の分子量は約20万であると推定された。

5 今回の一連の染色の結果により、子宮内膜組織に種々の糖鎖構造が発現されていることが明らかとなった。特に抗ケラタン硫酸抗体反応性糖鎖、ノイラミニダーゼ消化 GS-I は、内膜に特徴的な抗原である可能性が示唆された。

本研究の要旨は、第40回(1988年4月、大阪)および第41回日本産婦人科学会総会(1989年4月、岡山)および第48回日本癌学会総会(1989年10月、名古屋)で発表した。

本研究を遂行するに際し、終始懇篤なご指導を賜った信州大学医学部産科婦人科学教室福田透教授、塚原嘉治助教授、国立松本病院産婦人科野口浩博士、丸の内病院産婦人科富田和彦博士、さらには臨床検査医学教室勝山努助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 野田起一郎：婦人科癌検診問題委員会報告。日産婦誌，34：122-128，1982
- 2) Bast, R.C., Jr., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L.M., Colvin, R.B. and Knap, R.C. : Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. J Clin Invest, 68 : 1331-1337, 1981
- 3) Hakomori, S. : Tumor-associated carbohydrate antigens. Ann Rev Immunol, 2 : 103-126, 1984
- 4) Pettersson, F. : Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. F.I.G.O. (International Federation of Gynecology and Obstetrics). Vol. 20, pp. 29-109, Stockholm, 1986
- 5) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685, 1970
- 6) Dunkan, D.A., Mazur, M.T. and Younger, B. : Glycoconjugate distribution in normal human endometrium. Int J Gynecol Pathol, 7 : 236-248, 1988
- 7) Bychkov, V. and Toto, P.D. : Lectin binding to normal human endometrium. Gynecol Obstet Invest, 22 : 29-33, 1986
- 8) Soederstroem, K.O. : Lectin binding to formalin-fixed paraffin sections of human endometrium. Int J Gynecol Pathol, 6 : 55-65, 1987
- 9) Bychkov, V. and Toto, P.D. : Histochemical study of lectin binding to gestational endometrium. Int J Gynecol Pathol, 6 : 66-72, 1987
- 10) Lee, M.C. and Damjanov, I. : Pregnancy related changes in the human endometrium revealed by lectin histochemistry. Histochemistry, 82 : 275-280, 1985
- 11) Kluskens, L.F., Kluskens, J.L. and Bibbo, M. : Lectin binding in endometrial adenocarcinoma. Am J Clin Pathol, 82 : 259-266, 1984

- 12) 杉森 甫, 大隈良成, 岩坂 剛: 婦人科悪性腫瘍に対するレクチン染色の応用. 産と婦, 54: 1496-1499, 1987
- 13) Sundarraj, N., Chao, J., Gregory, J.D. and Damle, S.P.: Ocular distribution of keratan sulfates during pre and postnatal development in rabbits. J Histochem Cytochem, 34: 971-976, 1986
- 14) Ehara, T. and Katsuyama, T.: Glycoconjugate histochemistry of granular cell tumor. Virchows Arch [A], in press
- 15) Goldstein, H.: Glycoconjugates. pp.246-247, Elsvier, New York, 1965
- 16) Lennarz, W.J.: The Biochemistry of Glycoproteins and proteoglycans. pp.314-318, Plenum Press, New York, 1980
- 17) Caterson, B., Christner, J.E. and Baker, J.R.: Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratan sulfate. J Biol Chem, 258: 8848-8854, 1983
- 18) Mehmet, H., Scudder, P., Tang, P.W., Hounsell, E.F., Caterson, B. and Feizi, T.: The antigenic determinant recognized by three monoclonal antibodies to keratan sulphate involve sulphated hepta-or larger oligosaccharides of the poly (N-acetylactosamine) series. Eur J Biochem, 157: 385-391, 1986
- 19) Shiozawa, T., Tsukahara, Y. and Katsuyama, T.: Characterization of glycoconjugates in human endometrium. (発表準備中)
- 20) 久布白兼行: ヒト子宮内膜の糖脂質に関する生化学的研究. 一硫酸化糖脂質の発現とその月経周期における変化を中心として一. 日産婦誌, 41: 397-404, 1989
- 21) 小倉 卓, personal communication.
- 22) Hayes, C.E. and Goldstein, I.J.: An alpha-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. J Biol Chem, 249: 1904-1914, 1974
- 23) Flint, F.F., Schulte, B.A. and Spicer, S.S.: Glycoconjugate with terminal α galactose. Histochemistry, 84: 387-395, 1986
- 24) Wu, T.C., Wan, Y.J. and Damjanov, I.: Fluorescein-conjugated *Bandeiraea simplicifolia* lectin as a marker of endodermal, yolk sac and trophoblastic differentiation in the mouse embryo. Differentiation, 24: 55-59, 1983
- 25) Damjanov, I.: Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab Invest, 57: 5-20, 1987
- 26) Nakayama, J., Ota, M., Honda, T. and Katsuyama, T.: Histochemical demonstration of sugar residues by lectin and immunocytochemical techniques for blood group antigens. Histochem J, 19: 454-464, 1987
- 27) Goldstein, I.J. and Hayes, C.C.: The lectins: Carbohydrate binding proteins. Adv Carbohydr Chem Biochem, 35: 127-340, 1978
- 28) Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S. and Sato, E.: Glycoconjugates 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
- 29) Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D. and Sharon, N.: The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). J Biol Chem, 250: 8513-8523, 1975
- 30) 広橋説男: 糖鎖抗原と新しい腫瘍マーカー. 治療, 68: 28-32, 1986
- 31) 諏訪文明, 有馬輝勝, 福島正樹: PNA レクチン結合性蛋白の免疫組織学的研究. 消化器と免疫, 14: 224-249, 1985
- 32) 小笠原利忠: 子宮内膜癌に於ける血液型抗原の発現に関する免疫組織学的研究. 産婦 進歩, 39: 223-234, 1987
- 33) Szulman, A.E.: The histological distribution of blood group substances A and B in man. J

Exp Med, 111 : 785-799, 1960

- 34) Inoue, M., Sasagawa, T., Saitou, J., Shimizu, H., Ueda, G., Tanizawa, O. and Nakayama, M. : Expression of blood group antigens A, B, H, Lewis-a, Lewis-b in fetal, normal and malignant tissues of uterine endometrium. *Cancer*, 60 : 2985-2993, 1987
- 35) Yuan, M., Itzkowitz, S.H., Palekar, A., Shamsuddin, A.M., Phelps, P.C., Trump, B.F. and Kim, Y.S. : Distribution of blood group antigens A, B, H, Lewis^a, Lewis^b in human normal, fetal, and malignant colonic tissue. *Cancer Res*, 45 : 4499-4511, 1985
- 36) Lee, A.K., Delellis, R.A., Rosen, P.P., Sagio, P.E., Gangi, M.D., Bigin, R., Groshen, S. and Wolfe, H.J. : ABH blood group isoantigen expression in breast carcinomas-An immuno-histochemical evaluation using monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol*, 83 : 308-319, 1985
- 37) 井上正樹, 笹川寿之, 清水千賀子, 清水 廣, 斎藤淳子, 上田外幸, 谷沢 修, 中山雅弘 : 子宮内膜の癌化に伴う Lewis 抗原群の変化. *日産婦誌*, 40 : 1425-1431, 1988

(1. 10. 17 受稿)