

ヒト肺癌組織におけるフィブロネクチンの 局在に関する免疫組織化学的研究

大 橋 昌 彦

信州大学医学部第2外科学教室
(指導: 飯田 太教授)

Immunohistochemical Studies on the Localization of Fibronectin in Human Lung Cancer Tissues

Masahiko OOHASHI

Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Futoshi IIDA)

The distribution of fibronectin in human lung cancer tissues was examined by immunohistochemical methods. Twenty-nine surgical specimens, 14 adenocarcinomas and 15 squamous cell carcinomas, were used for the study. For light microscopy, the paraffin sections were stained by the ABC method using anti-human fibronectin antibody. For electron microscopy, ultrathin sections of Lowicryl K4M-embedded tissues were stained by protein A-gold technique using the anti-human fibronectin antibody.

Light microscopic observation of the adenocarcinomas revealed that fibronectin was localized on the basement membrane of the cancer cells. By electron microscopy, it was confirmed that fibronectin was localized on the basement membrane of the cancer cells. In the squamous cell carcinomas, on the other hand, fibronectin was found by light microscopy on the basement membrane and lateral sides of the cancer cells. By electron microscopy, fibronectin was observed to be localized on the basement membrane and intercellular spaces of the cancer cells.

From the results, definite differences of the localization of fibronectin between the two types of human lung cancers were confirmed. It is suggested that these differences might result in the distinctive clinical features of how metastasis and invasion of cancer cells occur in each of the two types of lung cancer. *Shinshu Med. J.*, 38: 107-117, 1990

(Received for publication October 9, 1989)

Key words: Immunohistochemistry, Fibronectin, Human lung cancer
免疫組織化学, フィブロネクチン, ヒト肺癌

I 緒 言

Fibronectin (FN) は、血漿、結合組織、細胞基底膜など体中いたるところに存在する高分子糖蛋白質であり、分子量が 210~230kd の単量体が S-S 結合により、2 量体以上の多量体を形成している¹⁾。FN の生理作用には、細胞接着、細胞移動、細胞分化、組

織修復などがあり、さらに、細胞の癌化、転移などにも関係しているといわれており、細胞の癌化にともなう FN 量の減少や、FN 投与による癌細胞の正常化と転移抑制が報告されている¹⁾²⁾。In vivo においては甲状腺³⁾、皮膚⁴⁾、乳腺⁵⁾⁶⁾、消化管⁶⁾⁷⁾、肝臓⁸⁾、子宮⁹⁾¹⁰⁾などの組織について生化学的、形態学的研究が行われて来た。ヒト肺組織においては、炎症性疾患や

慢性疾患についての形態学的、生化学的報告がある¹¹⁾。

培養癌細胞を使用した *in vitro* の研究では、細胞の癌化にともない FN は細胞表面より消失するといわれており¹²⁾¹³⁾, *in vivo* においても FN が細胞の悪性化に大きく関与している可能性が示唆されている¹⁴⁾。消化器癌⁶⁾⁷⁾ や子宮癌⁹⁾ では、FN は癌細胞表面には認められないと報告されているが、必ずしも常に消失するわけではなく、乳癌組織では、癌の分化度により FN の発現と消失に差があることが知られており¹⁵⁾, また乳癌や肺癌患者の血清 FN 値が上昇するとの報告もある¹⁶⁾。

肺癌組織では、臨床上よく遭遇する腺癌と扁平上皮癌の間に、明らかに転移進展様式に違いを認めるが¹⁷⁾ この違いが果たして何に起因するのか未だ定かではない。肺癌組織における FN の形態学的ならびに生化学的研究に関しては、最近、報告¹⁸⁾¹⁹⁾ が散見されるがいまだ十分解明されていない。著者は、肺癌のうち臨床上しばしば遭遇する腺癌と扁平上皮癌について、組織型および分化度と FN との関係を明らかにするため、免疫組織化学的手法を用い、光学顕微鏡の観察に加え電子顕微鏡の観察を行ったので報告する。

II 材料と方法

A 組織材料と組織固定法

組織材料は、原発性肺癌として外科的に切除された肺癌組織を使用し、対照組織としては、切除肺の非癌部組織を使用した。予備実験17症例のほか、光学顕微鏡的観察のために29症例(表1)を使用した。手術により切除した肺癌組織を10%中性ホルマリンで固定したのち、エタノール系列で脱水して、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋組織より、ミクロトーム(ヤマ

トO型)で4 μ mの薄切片を作製し、スライドガラスに貼付した。全症例について、まず1枚の切片に通常のヘマトキシリン・エオジン染色を行い、肺癌組織および肺癌組織であることを確認し、肺癌取扱規約²⁰⁾にしたがって組織型および分化度分類を行ったのち、隣接切片を用いて免疫組織化学的染色を行った。

光学顕微鏡の観察で安定して使えた肺癌症例29例中から9例を電子顕微鏡的観察に使用した。手術中採取した肺癌組織の一部を約1mmの立方体に細切し、pH7.4のリン酸緩衝液で緩衝した4%パラホルムアルデヒドと0.1%グルタルアルデヒドの混合液に24時間固定した。0.1Mリジンを pH7.4 の0.15M塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液で洗浄したのち、エタノール系列中で脱水して、-20°C でロビクリールK4Mに低温包埋し紫外線重合した。包埋ブロックからPorter Blum MT2-B 超ミクロトーム(DuPont-Sorvall)で、ガラスナイフを用いて1 μ mの薄切片を作成し、pH7.4のリン酸緩衝液で緩衝した0.1%トルイジンブルーで染色したのち、光学顕微鏡で癌組織であることを確認した。同組織から同様に0.1 μ mの超薄切片を作製し、ホルムパールで被覆したニッケルグリッドに採取し、免疫染色を施した²¹⁾。

B 光学顕微鏡標本の免疫染色および観察法

光学顕微鏡標本の免疫染色は Hsu ら²²⁾ に従い、Avidine-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 法を行った。

肺癌組織としては、固定がよく、観察所見に規則性の観られた腺癌14例、扁平上皮癌15例の29例(表1)を選んだ。脱パラフィン切片を用いて、1%正常ヤギ血清で30分、ついで抗ヒトフィブロネクチンウサギ血清(和光純薬KK, 大阪)を一次抗体として1時間湿箱中、室温で反応させ、ビオチン化抗ウサギ IgG に1時間、さらに、アヴィジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合溶液(Vector Laboratories Inc. CA. USA)の中で1時間反応させた。一次抗体は、150mM 塩化ナトリウムを含んだ pH7.4 の 200mM リン酸緩衝液で300倍に希釈して用いた。次に、50mM トリス塩酸緩衝液で緩衝した0.05%3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩と0.01%過酸化水素を含む DAB 反応液中で10分間発色させた。ペロナル酢酸緩衝液で緩衝した1%メチルグリーン水溶液中で核染色を行い、封入したのちオリンパス光学顕微鏡 Vanox AHB-LB で観察した。対照としては、一次抗体の代わりに300倍希釈したウサギ正常血清を使用して染色を行った。

表1 対 象

原発性肺癌症例	29例
腺 癌	14例
高分化型	6
中分化型	7
低分化型	1
扁平上皮癌	15例
高分化型	5
中分化型	5
低分化型	5

C 電子顕微鏡標本の免疫染色と観察法

Roth ら²³⁾に従い、プロテインA金 (pAg) 法を行った。ニッケルグリッド上の切片を、0.5%のウシアルブミン溶液で30分、一次抗体で1時間、希釈プロテインA金溶液で1時間の順に湿箱中、室温で作用させた。一次抗体としては、300倍希釈の抗ヒトフィブロネクチンウサギ血清 (和光純薬KK, 大阪) を用いた。これらの溶液の希釈には、0.5%ウシアルブミンと、150mM 塩化ナトリウムを含む 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6) を用いて行った。1%酢酸ウラン溶液中で5分間、4%クエン酸鉛溶液中で4分間電子染色して、日立 H-700型電子顕微鏡 (加速電圧200kV) により観察した。染色の対照としては、一次抗体の代わりに300倍希釈したウサギ正常血清を使用して染色を行った。

III 結 果

A 光学顕微鏡による観察結果

一定の染色性を得るために、浸漬のみの固定と還流固定を加えた固定の合わせて17例の予備実験を比較した結果、浸漬固定に還流固定を加えた方が良いと判断されたので、本研究では還流固定を加えた29例 (表1) の結果を報告する。

免疫反応の評価は、濃淡の程度とは関係なく、茶褐色の反応産物を認めたものを陽性 (+)、対照と同じ緑色であったものは陰性 (-) とした。

1 染色の対照実験

一次抗体として抗ヒトフィブロネクチンウサギ血清の代わりに正常ウサギ血清を使用すると、正常肺組織 (表2)、腺癌 (表2, 図1) および扁平上皮癌 (表2) のいずれにおいても反応は陰性であった。

2 正常肺組織

抗ヒトフィブロネクチンウサギ血清を用いた染色では、気管支粘膜の上皮基底膜、気管支腺基底膜、間質 (表2, 図2)、肺胞上皮基底膜、毛細血管壁に陽性反応産物が観察された (表2)。

3 肺癌組織

a 高分化型腺癌。弱拡大では、癌細胞には免疫反応産物は認められなかったが、比較的幅が一定で網状に錯綜して連なる間質に陽性反応産物が観察された (表2)。強拡大では、弱拡大で網状に見えた間質のほかに、癌細胞基底膜に沿って陽性反応産物が観察された。しかし、癌細胞の核および細胞質、癌細胞間には、免疫反応産物は観察されなかった (表2)。

表2 光学顕微鏡観察結果

組 織	核	細胞質	基底膜	細胞間	間質
染色対象					
正常気管支粘膜	-	-	-	-	-
肺胞上皮	-	-	-	-	-
腺癌組織	-	-	-	-	-
扁平上皮癌組織	-	-	-	-	-
正常肺組織					
気管支粘膜					
粘膜上皮	-	-	+	-	+
気管支腺	-	-	+	-	/
肺 胞					
肺胞上皮	-	-	+	-	-
毛細血管	-	-	+	-	/
肺癌組織					
腺 癌					
高分化型弱拡大	-	-	/	-	+
強拡大	-	-	+	-	+
中分化型弱拡大	-	-	/	-	+
強拡大	-	-	+	-	+
低分化型弱拡大	-	-	/	-	+
強拡大	-	-	+	-	+
扁平上皮癌					
高分化型弱拡大	-	+	/	+	+
強拡大	-	+	+	+	+
中分化型弱拡大	-	+	/	+	+
強拡大	-	+	+	+	+
低分化型弱拡大	-	+	/	+	+
強拡大	-	+	+	+	+

+ : 反応産物陽性, - : 反応産物陰性

b 中分化型腺癌。弱拡大では、免疫反応産物は、癌細胞に認められず、網状に交錯した間質に観察されたが、幅は一定せず、一部に反応の微弱な部分も認められた (表2)。強拡大では、網状に広がる間質と、癌細胞基底膜に免疫反応産物が認められたが、高分化型腺癌と同様に癌細胞の核と細胞質、癌細胞間には陽性反応産物は認められなかった (表2)。

c 低分化型腺癌。弱拡大では、高分化型、中分化型腺癌と同様に、癌細胞には免疫反応産物は認められず、網状に広がる間質に免疫反応産物が観察された (表2)。強拡大では、免疫反応産物は、網状の間質と癌細胞の基底膜に観察されたが、癌細胞の核と細胞質、癌細胞間には陽性反応産物は、認められなかった (表2, 図

3)。

d 高分化型扁平上皮癌。弱拡大では、癌胞巣周辺の癌細胞に強い免疫反応が観察され、また、癌胞巣間の間質にも一様に観察された(表2)。強拡大では、癌胞巣間間質はもちろん癌細胞の細胞質と基底膜、癌細胞間に陽性反応産物が認められた(表2)。

e 中分化型扁平上皮癌。弱拡大では、高分化型と同様に、癌胞巣周囲の癌細胞に強く、また、癌胞巣間の間質にも一様に陽性反応産物が観察された(表2)。強拡大では、癌胞巣間の間質のほか癌細胞細胞質および基底膜と癌細胞間に陽性反応産物が認められた(表2, 図4)。

f 低分化型扁平上皮癌。弱拡大では、高分化型、中分化型と同じく癌細胞と癌胞巣間の間質に陽性反応産物が観察された(表2)。強拡大では、癌胞巣間の間質のほか癌細胞の細胞質と基底膜、癌細胞間に陽性反応産物を認めた(表2)。

B 電子顕微鏡による観察結果

光学顕微鏡観察の結果では、肺癌組織におけるFNの局在の相違はおもに組織型によるもので、分化度別には著明な差がないことが明らかになったため、光学顕微鏡観察を行った29例中より、腺癌4例、扁平上皮癌5例の9例を選び分化度に関係なく電子顕微鏡観察を行った。

免疫反応の評価は、約10個以上の金粒子が規則性を持って集簇して観察されるものを陽性(+)とし、金粒子が小数であったり、集簇していても規則性が認められないものは、陰性(-)とした。

1 対照実験

一次抗体として抗ヒトフィブロンクチンウサギ血清の代わりに正常ウサギ血清を使用した。正常肺組織、腺癌および扁平上皮癌のいずれにおいても反応は陰性であった(表3)。

2 正常肺組織

免疫染色による金粒子は、肺胞壁の毛細血管内皮細胞基底膜、肺胞上皮基底膜に観察された(表3)。

表3 電子顕微鏡観察結果

組 織	核	細胞質	基底膜	細胞表面	細胞間	線維芽細胞	細線維
染色対象							
正常気管支粘膜	-	-	-	-	-	-	-
肺胞上皮	-	-	-	-	-	/	/
腺癌組織	-	-	-	-	-	-	-
扁平上皮癌組織	-	-	-	-	-	-	-
正常肺組織							
肺 胞							
肺胞上皮	-	-	+	-	-	/	/
血管内皮細胞	-	-	+	-	-	/	/
肺癌組織							
腺 癌	-	-	+	-	-	-	+
扁平上皮癌	-	+	+	-	+	-	+

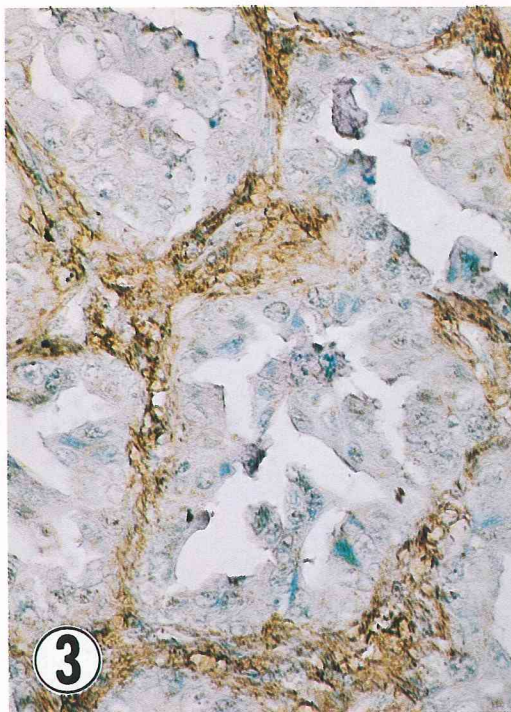
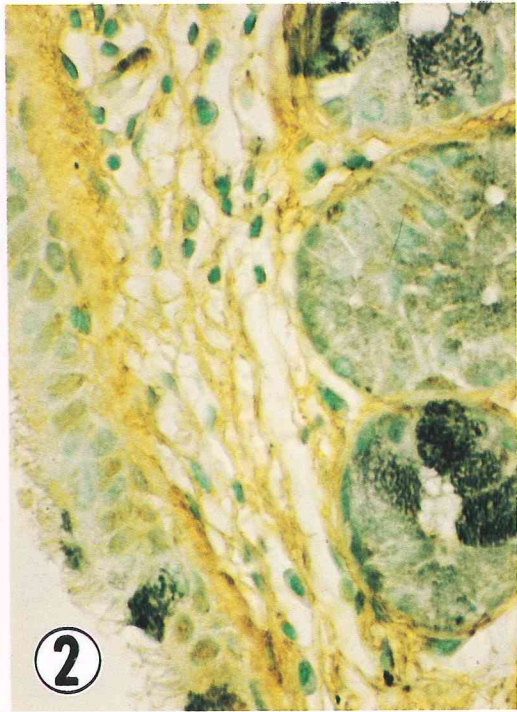
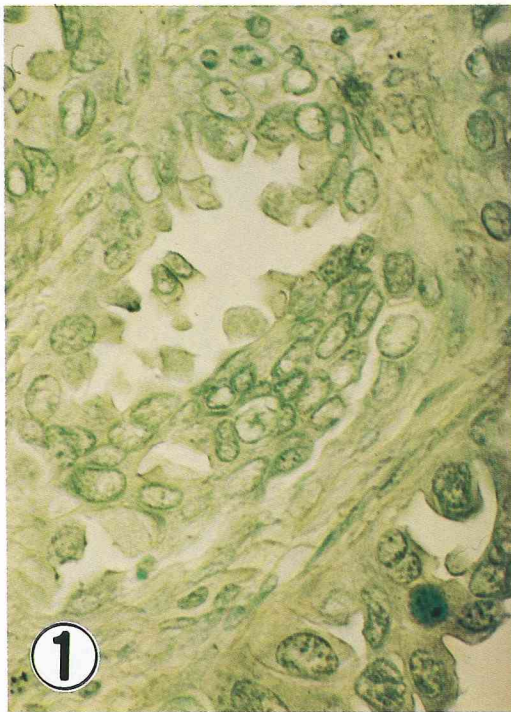
+ : 金粒子陽性, - : 金粒子陰性

図1 腺癌組織光顕写真, ABC 法染色対照: 免疫反応産物はまったく観察されない。×1,200

図2 正常気管支粘膜光顕写真, ABC 法: 粘膜上皮基底膜, 気管支腺基底膜, 間質に茶褐色の陽性反応産物が観察される。×600

図3 低分化型腺癌光顕写真, ABC 法: 癌細胞基底膜, 間質に茶褐色の陽性反応産物が観察される。×900

図4 中分化型扁平上皮癌光顕写真, ABC 法: 癌細胞質, 癌細胞基底膜, 癌細胞間, 間質に茶褐色の陽性反応産物が観察される。×1,800



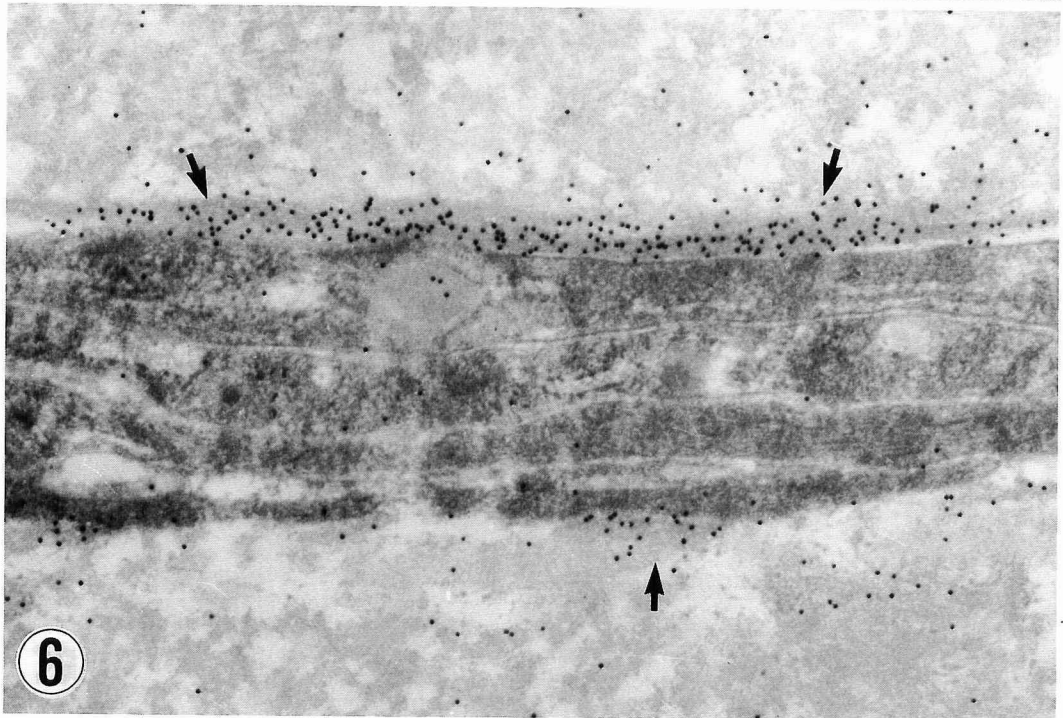
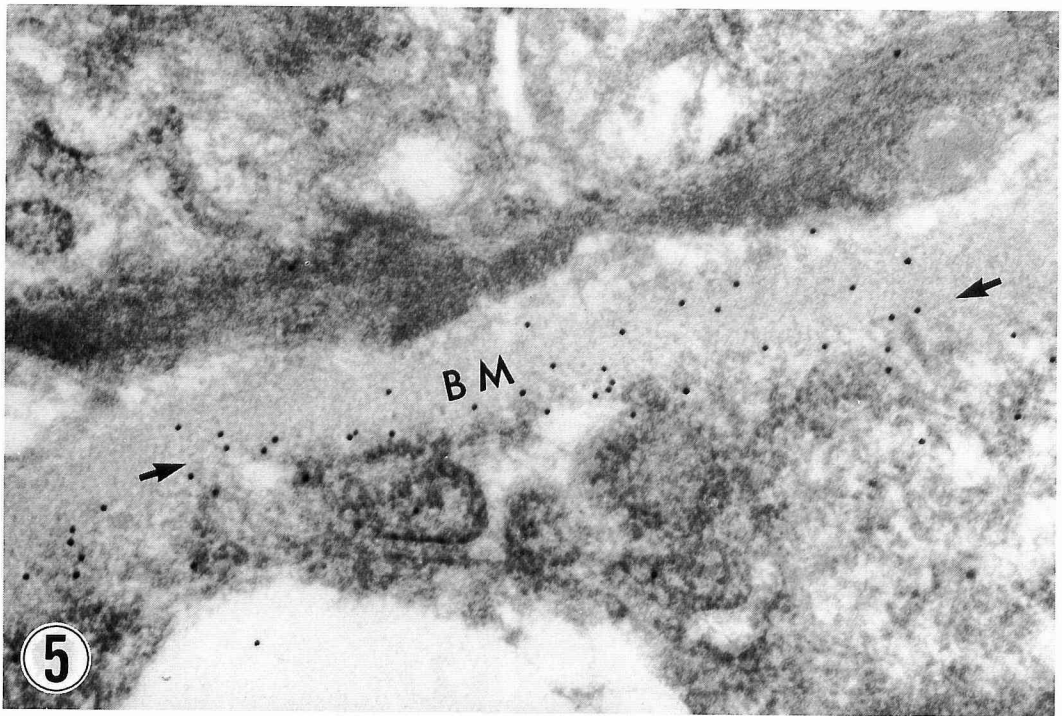


図5 腺癌細胞電顕写真，pAg 法：癌細胞基底膜（BM，↑）に明瞭に金粒子が認められる。×50,000

図6 腺癌組織内線維芽細胞電顕写真，pAg 法：線維芽細胞に接した基質に（↑）金粒子が認められる。×42,000

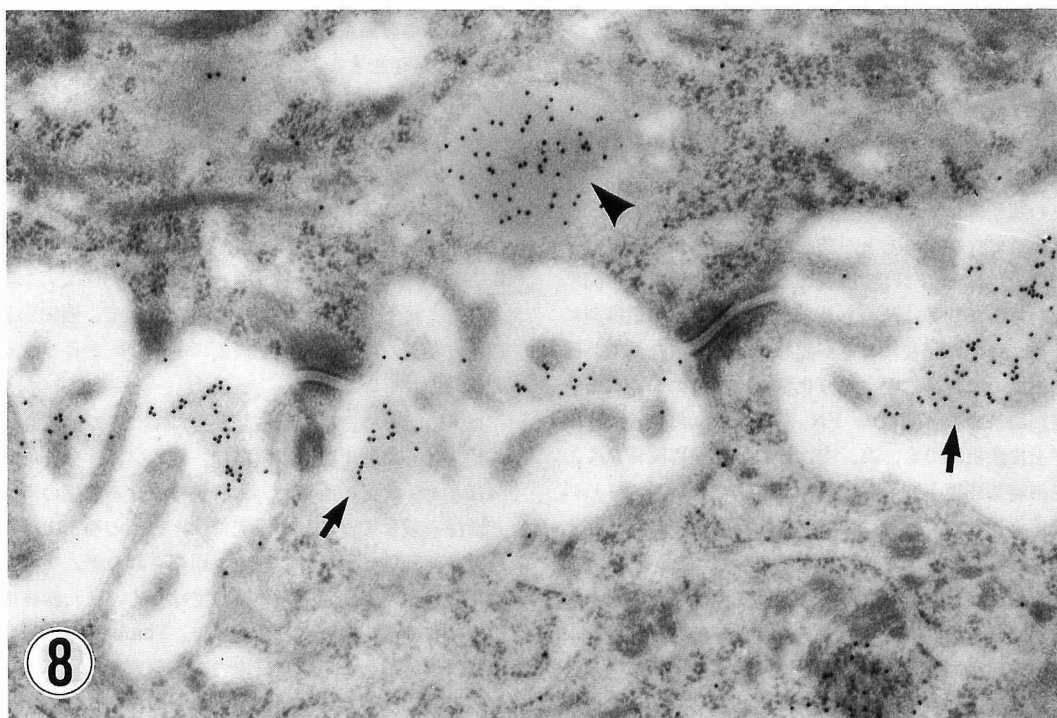
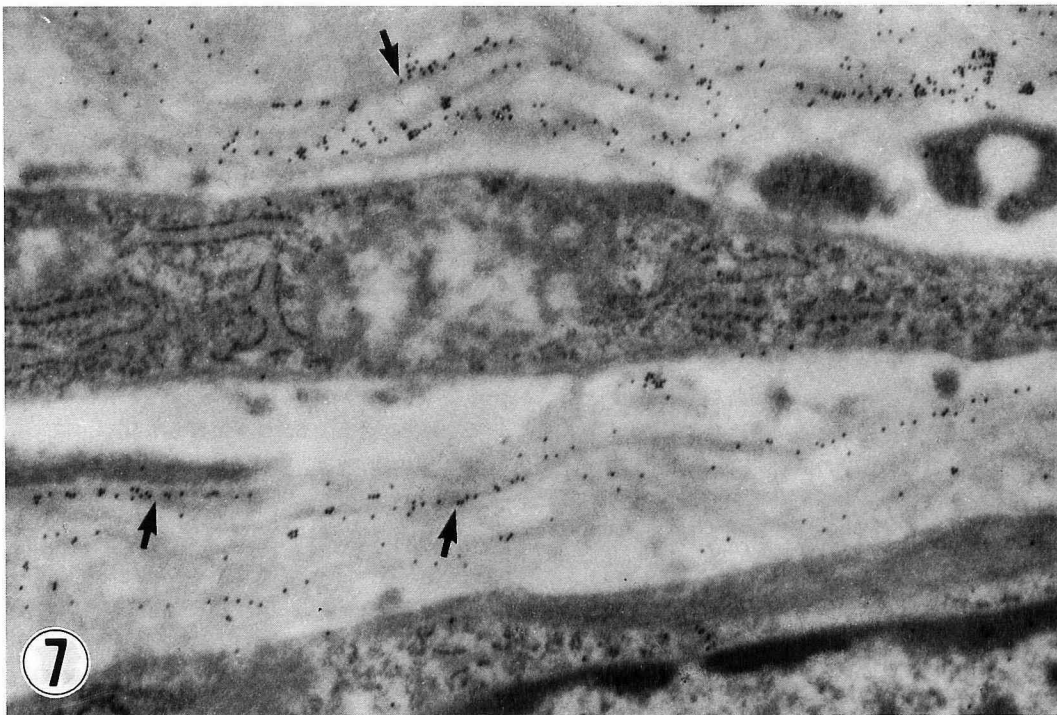


図7 腺癌組織間質，線維芽細胞電顕写真，pAg 法：細線維の周囲（↑）に金粒子を認める。×32,000

図8 扁平上皮癌細胞電顕写真，pAg 法：癌細胞間物質（↑）に金粒子が観られるが，癌細胞表面に金粒子は認められない。癌細胞細胞質の不定形な物質（▲）に金粒子が観られる。×36,000

3 肺癌組織

a 腺癌。金粒子は癌細胞基底膜に観察され、癌細胞表面や周囲には、観察されなかった(表3, 図5)。また、核および細胞質の小器官にも金粒子は認められなかった。間質では、金粒子は線維芽細胞に接した基質および細線維の表面に観察された(図6, 7)。

b 扁平上皮癌。癌細胞の細胞膜の一部はデスモームで接着しているが、それ以外は30 μ mの間隙をもって離れている。金粒子は、癌細胞基底膜に認められるものの少数であった。また、金粒子は癌細胞間の電子密度の高い不定形の物質上にも観察されたが、癌細胞表面には観察されなかった(表3, 図8)。一部の癌細胞ではその細胞質や癌細胞に接し一重の膜をもつ球状の小器官に金粒子の局在が認められた(図8)。その小器官の基質は無構造で、電子密度は上記の細胞間の不定形な物質と同程度であった。小胞体、ゴルジ装置、核は反応陰性であった。間質では腺癌と同じく線維芽細胞や細線維の表面に金粒子が認められた。

IV 考 察

本研究には肺癌症例17例の予備実験を行い、一定の染色性を得るためには浸漬固定に還流固定を加えた方が良いと判断され、一定の染色性を得られた29例を検討した。

光学顕微鏡での観察では、Clarkら¹¹⁾が正常肺組織ですでに報告しているように、FNは気管支粘膜上皮の基底膜、気管支腺基底膜、毛細血管壁、肺胞上皮基底膜に存在することが確認された。肺癌組織では、癌の分化度とFNの出現あるいは存在様式との間には明らかな関係は認められなかったが、癌の組織型によりFNの局在に相違が認められた。すなわち、腺癌組織では、高、中、低分化型のいずれにおいても、癌細胞基底膜と間質にFNが観察された。一方、扁平上皮癌組織でも、高、中、低分化型に関係なく、癌細胞基底膜と間質にFNが観察されたが、さらに腺癌と異なり癌細胞間にもFNが観察された。

電子顕微鏡による正常肺組織の観察では、FNは、肺胞上皮基底膜、血管内皮細胞基底膜のほか線維芽細胞や膠原線維周囲にも観察されると報告されており²⁴⁾、著者も同様の所見を得た。肺癌について光学顕微鏡の所見を電子顕微鏡の所見と対比させると、FNの局在はほぼ一致し、電子顕微鏡による観察で細胞小器官レベルでの局在が判明した。腺癌では、光学顕微鏡で観察されたごとく、FNは癌細胞基底膜に認められた。

扁平上皮癌では、腺癌と同様に癌細胞基底膜にFNが観察されたが、それに加え癌細胞周囲にも観察されたことが特異な所見であった。また、癌細胞周囲のFNの局在が癌細胞の細胞膜ではなく、癌細胞間物質であることが判明した。光学顕微鏡の観察で癌細胞間の間質に観察された反応は、線維芽細胞や間質を構成する細線維であることが明らかになった。

以上のように、ヒト肺癌組織では、光学顕微鏡の観察で、腺癌組織と扁平上皮癌組織の間にはFNの存在様式に明らかな相違がみられた。従来組織細胞FNの局在については、正常組織、病理組織についていくつかの報告があるが、肺癌組織における局在についての報告はなく、本論文が最初である。

他臓器の腺癌組織と比較してみると、教室のSugenoyaら³⁾が報告した甲状腺癌では、組織型により多少異なるが、癌細胞基底膜にFNを認め、未分化癌のみに細胞質にFNが観察された。大腸癌⁶⁾では、FNは間質にのみ観察され、癌細胞基底膜には観察されていない。子宮体癌⁹⁾では、癌細胞基底膜と、間質に認められている。すなわち、FNの出現は臓器組織により多少の差異はあるが、肺以外の臓器の腺癌組織でも、肺の腺癌組織と同様に、癌細胞基底膜と、間質にFNが存在するようである。しかし、乳癌^{5,6)}では組織型の違いにより発現程度に差があり、癌細胞を取り巻くようにFNを認めるが、基底膜側にもFNは観察されるという報告と、観察されないとの報告がみられ、一致した見解はない。また、光学顕微鏡レベルでは、乳癌で癌細胞の細胞質内にFNを認めたとの報告²⁵⁾がある。

一方、扁平上皮癌では、子宮頸癌⁹⁾¹⁰⁾で、癌細胞基底膜と間質のほか、癌細胞表面にもFNが存在すると報告されている。

以上のように、癌細胞の基底膜にFNが観察されることは、癌発生臓器、組織型、あるいは、分化度に関係なく、共通の所見で、本研究における肺癌の所見とはほぼ一致している。本研究では、一部の扁平上皮癌細胞の細胞質にFNの局在が観察されたが、すべての扁平上皮癌細胞に共通の所見ではなく、また腺癌細胞にはまったく観察されなかった。Yamadaら²⁶⁾は、培養線維芽細胞を用いた研究で、細胞質内のFNは、ゴルジ装置と小胞体に観察されると報告している。また、Hedman²⁷⁾は、胎児皮膚を用い、同様の所見を報告している。甲状腺癌³⁾、乳癌²⁵⁾、肝癌²⁸⁾などでも癌細胞の細胞質にFNが存在するという報告もある。

り、とくに肝癌²⁸⁾では小胞体に FN が観察されている。光学顕微鏡レベルの酵素抗体法による報告²⁹⁾においても、また、電子顕微鏡レベルでのプロテイン A 金法³⁰⁾によっても、免疫反応の強さや反応産物の量は細胞中の抗原の量に依存しており、たとえ細胞中あるいは組織中に抗原があっても、その量が比較的小さい場合は反応産物は陰性になることが知られている。本研究では、扁平上皮癌細胞の細胞質内に反応陽性の顆粒がみられたが、ゴルジ装置、小胞体等の小器官は陰性であり、この反応陽性所見が癌細胞が FN を合成していることを示すのか、あるいは飲作用によるものかは明らかにできなかった。

肺癌組織の臨床上的特徴として、腺癌では、腫瘍径の小さいうちからリンパ節転移や遠隔転移が認められるのに対して、扁平上皮癌では、直接浸潤する傾向が強く、腫瘍径がある程度大きくなってから転移することが知られている¹⁷⁾。癌細胞の転移と FN の関係を見ると、Smith ら³¹⁾は、ヒト癌細胞から得た培養細胞で、非転移性の細胞より転移性の細胞の方が FN 量が少ないと報告し、Lanbert-Robert ら¹⁵⁾は、乳癌組織で非転移性のものでは細胞周囲、基底膜に FN を認めるが、転移性のものではこの部に FN を認めなかったと報告している。

癌転移の成立には FN 以外にも要因が考えられているが、Zucker ら³²⁾も指摘しているように肺癌組織においては、組織型による転移、進展の違いに FN が関与している可能性が推測された。

本研究において示されたように、FN は腺癌では基底膜にのみ、扁平上皮癌では基底膜に加え、癌細胞間にも分布するという局在様式に差がみられた。肺癌のリンパ節転移は扁平上皮癌よりも腺癌に発生しやすい

という事実¹⁷⁾と併せて考え、ヒト肺癌においても、FN の局在の違いが転移、進展に何等かの影響を及ぼす可能性が示唆された。

V 結 語

ヒト肺癌組織において、免疫組織化学的方法を用い、光学顕微鏡的、電子顕微鏡的に FN の局在を研究した。その結果次のことが明らかとなった。

1 ヒト肺癌では、腺癌と扁平上皮癌とで FN の局在に相違を認めた。

2 腺癌組織では、癌細胞基底膜と間質の線維芽細胞や細線維の表面に FN を認めた。

3 扁平上皮癌組織では、癌細胞基底膜、癌細胞間に FN を認めたが、癌細胞表面には認められなかった。間質では、線維芽細胞の表面や細線維に認められた。癌細胞質内にもわずかではあるが FN の存在を認めた。

以上の結果よりヒト肺癌においては、腺癌と、扁平上皮癌の組織型により FN の局在が異なり、これが転移の成立にも関係している可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第26回日本肺癌学会総会(1985年11月、仙台)、第45回日本癌学会総会(1986年10月、札幌)、8th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (July-August, 1988, Washinton, D.C., USA) において発表した。

稿を終るにあたり、免疫組織化学理論を御教示頂いた第1解剖学教室永田哲士教授、および、組織化学の手技について御指導頂いた臼田信光講師に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 林 正男, 平野英保: フィブロネクチンの構造と機能. 蛋白・核酸・酵素, 28: 169-181, 1983
- 2) Hynes, R.: Molecular biology of fibronectin. Ann Rev Cell Biol, 1: 67-90, 1985
- 3) Sugeno, A., Usuda, N., Adachi, A., Ohashi, M., Nagata, T. and Iida, F.: Immunohistochemical studies on the localization of fibronectin in human thyroid neoplastic tissues. Endocrinol Jpn, 35: 111-120, 1988
- 4) Fleishmajer, R. and Timpl, R.: Ultrastructural localization of fibronectin to different anatomic structures of human skin. J Histochem Cytochem, 32: 315-321, 1984
- 5) Christensen, L., Nielsen, M., Holund, B. and Clemmensen, I.: Differentiation between metaplastic carcinomas and sarcomas of human female breast by fibronectin. Virchows Arch [A], 407: 465-476, 1985
- 6) Loidon-Rosa, B., Vielh, P., Cuadrado, C. and Burtin, P.: Comparative distribution of fibronectin and vitronectin in human breast and colon carcinomas. Am J Clin Pathol, 90:

- 7-16, 1988
- 7) 松田泰次, 浜田 宏, 安富正幸 : 大腸組織における酵素抗体法による fibronectin の組織化学的研究. 日消会誌, 15 : 1798-1806, 1982
 - 8) Pick-Kober, K.H. and Gressner, A.M. : Fibronectin is synthesized as an acute phase reactant in rat hepatocytes. J Clin Chem Clin Biochem, 24 : 521-528, 1986
 - 9) 高橋修三, 斎藤良治, 一関和子, 真木正博 : 婦人科における悪性腫瘍とフィブロネクチン. 最新医学, 39 : 2066-2069, 1984
 - 10) Leppi, T.J., Repesh, L.A., Furcht, L.T., Bartzen, P.J. and Holt, G.E. : Immunohistochemical localization of fibronectin in human and rat uterine cervixes. J Histochem Biochem, 30 : 413-417, 1982
 - 11) Clark, J.G., Kuhn, C., III, McDonald, J.A. and Mecham, R.P. : Lung connective tissue. Int Rev Connect Tissue Res, 10 : 249-331, 1983
 - 12) Hynes, R. : Cell surface proteins and malignant transformation. Biochim Biophys Acta, 458 : 73-107, 1976
 - 13) Vaheri, A. and Mosher, D.F. : High molecular weight, cell surface-associated glycoprotein (fibronectin) lost in malignant transformation. Biochem Biophys, 516 : 1-25, 1978
 - 14) Yamada, K.M. and Olden, K. : Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature, 275 : 179-184, 1978
 - 15) Lambert-Robert, J., Birembaut, P., Adnet, J.J., Mercantini, F. and Robert, L. : Loss of fibronectin in human breast cancer. Cell Biol Int Rep, 4 : 609-616, 1980
 - 16) Todd, H.D., Coffee, M.S., Waalkes, M.D., Abeloff, M.D. and Parsons, R. G. : Serum levels of fibronectin and a fibronectin-like DNA-binding protein in patients with various diseases. J Natl Cancer Inst, 65 : 901-904, 1980
 - 17) 成毛韶夫 : 肺がんの拡大進展と外科手術との相関. 日外会誌, 68 : 1607-1620, 1967
 - 18) Grigioni, W.F., Biagini, G., Garbisa, S., D'errico, A., Milani, M., Mastroiilli, M., Vasi, V., Villanacci, V., Gozzetti, G. and Mancini, A.M. : Immunohistochemical study of basement membrane antigens in bronchioloalveolar carcinoma. Am J Pathol, 128 : 217-224, 1987
 - 19) Siri, A., Carnemolla, B., Raffanti, S., Balzano, E. and Zardi, L. : Fibronectin concentrations in pleural effusion of patients with malignant and non-malignant diseases. Cancer Lett, 22 : 1-9, 1984
 - 20) 日本肺癌学会編 : 肺癌取扱規約, pp.75-99, 金原出版, 東京, 1982
 - 21) Hashimoto, T., Kuwabara, T., Usuda, N. and Nagata, T. : Purification of membrane polypeptides of rat liver peroxisomes. J Biochem (Tokyo), 100 : 301-310, 1986
 - 22) Hsu, S.M., Raine, L. and Franger, H. : Use of Avidine-Biotin-Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem, 29 : 577-588, 1981
 - 23) Roth, J., Bendayan, M. and Orci, L. : Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. J Histochem Cytochem, 26 : 1074-1081, 1978
 - 24) Takusagawa, K., Asoo, N., Sato, T., Nagai, H., Motomiya, M. and Konno, K. : Immunoelectron microscopic observations on the localization of fibronectin in normal human lung. Tohoku J Exp Med, 150 : 209-223, 1986
 - 25) Christensen, L., Nielsen, M., Holund, B. and Clemmensen, I. : *In vitro* demonstration of cytoplasmic fibronectin human breast carcinoma. Virchows Arch [A], 407 : 337-346, 1985
 - 26) Yamada, S.S., Yamada, K.M. and Willingham, M.C. : Intracellular localization of fibronectin by immunoelectron microscopy. J Histochem Cytochem, 28 : 953-960, 1980
 - 27) Hedman, K. : Intracellular localization of fibronectin using immunoperoxidase cytochemistry in light and electron microscopy. J Histochem Cytochem, 28 : 1233-1241, 1980
 - 28) Okushin, H., Yamada, G. and Nagashima, H. : Immunohistochemical study of fibronectin,

- lysozyme, and α -fetoprotein (AFP) in human hepatocellular carcinoma. Gastroenterol Jpn, 22 : 44-54, 1987
- 29) Sternberger, L.A. : Immunocytochemistry. pp.172-184, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1974
- 30) Bendayan, M., Roth, R., Perrelet, A. and Orci, L. : Quantitative immunocytochemical localization of pancreatic secretory proteins in subcellular compartments of rat acinar cell. J Histochem Cytochem, 28 : 149-160, 1980
- 31) Smith, H.S., Riggs, J.L. and Mosseson, M. W. : Production of fibronectin by human epithelial cells in culture. Cancer Res, 39 : 4138-4144, 1979
- 32) Zucker, S., Turpeeniemi-Hujanen, T., Wieman, J.M. and Lysik, R.M. : Characterization of a connective tissue degrading metalloproteinase from human small cell lung cancer cells. Clin Exp Metastasis, 6 : 363-375, 1988

(1. 10. 9 受稿)
