

Distribution of Collagen Types(I ,Ⅲ,Ⅳ and V) and Laminin in the Stroma of Breast Carcinomas

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7911

乳癌の間質における型別コラーゲン (I型, III型, IV型およびV型) およびラミニンの局在

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

源 利 成

(昭和61年12月9日受付)

乳腺硬癌の間質の成因を調べるために、乳癌の間質における型別コラーゲン (I型, III型, IV型およびV型) ならびにラミニンの局在を、正常乳腺組織および良性乳腺病変 (乳腺症, 線維腺腫) における局在と比較して検索した。型別コラーゲンおよびラミニンの局在は、それぞれ型特異的抗ヒトコラーゲン抗体および抗ヒトラミニンモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法により観察した。正常乳腺では、I型およびIII型コラーゲンは主に小葉間の間質に分布していた。IV型コラーゲンとラミニンは基底膜に局限して分布していた。V型コラーゲンは小葉内の粗な間質にわずかに認められた。乳腺症および線維腺腫におけるこれらの分布パターンは、基本的には正常乳腺組織におけるものと類似していた。乳癌では、I型およびIII型コラーゲンは間質の結合組織にびまん性に分布していた。V型コラーゲンも間質に認められた。特に、V型コラーゲンは非硬癌に比べて硬癌において、より著明な染色性を示した。IV型コラーゲンとラミニンは癌細胞巢の辺縁に沿って連続的あるいは不連続線状に分布していた。さらに、硬癌の組織像を呈する部分では、癌細胞の有無にかかわらず間質の膠原線維束の辺縁に沿って局在していた。癌細胞は抗コラーゲン抗体あるいは抗ラミニン抗体のいずれによっても染色されなかった。以上の所見より、乳腺硬癌の成因は主に間質の反応性増殖によるもので、I型およびIII型コラーゲンに加えてV型コラーゲンが関与していることが示唆された。

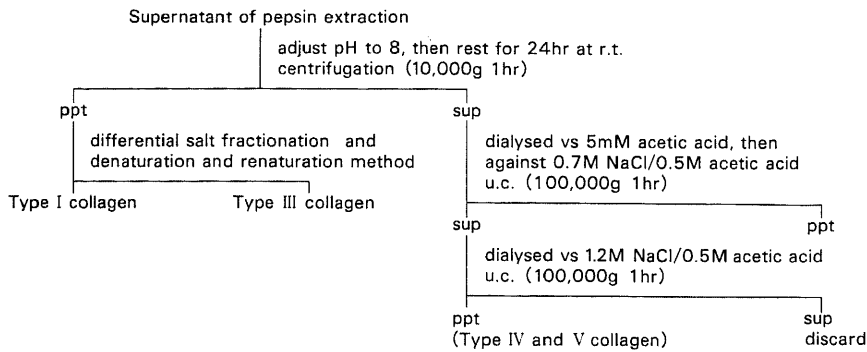
Key words breast, scirrhous carcinoma, collagen, laminin, immunofluorescence

乳癌に関して、従来から、主に腫瘍細胞 (上皮成分) に対する多くの研究がなされてきている。近年、他の臓器癌も含めて、癌の浸潤および転移の機序を視点をかえて解明しようとする試みがなされ、その間質成分および腫瘍細胞と間質との相互関係が重要視されるようになってきた。乳癌の種々の組織型のなかでも、浸潤性硬癌と浸潤性小葉癌の一部は他の組織型のものに比べて著明な間質結合組織の増生を示し、その間に癌細胞が散在性に浸潤する、いわゆる硬癌といわれる特異な形態を呈する。このような硬癌は乳腺のみならず胃にもしばしばみられ、いずれも進行が速く予後が不良とされているが¹⁾²⁾、その成因は明らかにはされていない。

硬癌間質の形成機序については、種々の研究がなされてきた。Jacksonらは、既存の間質が虚脱 (collapse) して濃縮されたものと考えた³⁾。一方、Al-Adnaniら⁴⁾やDouglasら⁵⁾は、癌細胞自身が過剰のコラーゲンやエラスチンを産生すると報告した。ところが、癌細胞と間質細胞の相互作用の結果、主に間質細胞が多量のコラーゲンやエラスチンを産生するという説が提唱され^{6)~11)}、この説が培養系の実験によって間接的に支持されるようになってきた^{11)~14)}。いずれにせよ、硬癌間質の主成分はコラーゲンであると考えられる。

現在、コラーゲンには、少なくとも遺伝的に異なる11種類の分子種 (I型~X型およびK型) が知られ

Abbreviations: Ag, silver impregnation; ALP, alkaline phosphatase; DEAE, diethylaminoethyl; EDTA, ethylenediaminetetra-acetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EVG, elastica Van Gieson; FITC, fluorescein isothiocyanate; H.E.,



hr, hour ; r.t., room temperature ; ppt, precipitate ; sup, supernatant ;
u.c., ultracentrifugation

Fig. 1. The procedure of bulk fractionation of collagen types I, III, IV, and V.

ている^{15)~22)}。そのうち、I型~V型コラーゲンに関してはその生化学的性質、機能および組織分布がかなり解明されてきている¹⁵⁾²³⁾²⁴⁾。癌の間質、特に硬癌の間質の形成機序に関する研究においては^{25)~29)}、これまでは形態学的手段が主に用いられ、コラーゲンやエラスチンに関する量的あるいは質的な検討は十分になされていない現状である。

そこで、著者は乳腺硬癌の間質の成因を明らかにするために、正常乳腺組織、良性乳腺病変（乳腺症、線維腺腫）および乳癌の間質における型別コラーゲン（I型、III型、IV型およびV型）ならびにラミニンの組織分布を、それぞれ型特異的抗ヒトコラーゲン抗体ならびに抗ヒトラミニンモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法により検索した。これらの分布パターンから、乳癌間質の質的特徴および硬癌間質の形成機序に関して考察を試みた。

材料および方法

I. 型別コラーゲンの調整

ヒト胎盤1個（湿重量約500g）を細切し、血液成分を除くために、中性蛋白分解酵素阻害剤（EDTA 5 mM, NEM 2 mM, PMSF 1 mM）を含む0.05 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.6 を用いて4°Cで洗浄し、同時にホモジナイズした。以後の実験操作は、ことわりがないかぎり、すべて4°Cで行った。次に、非コラーゲン蛋白質をできるだけ除去するために、2 M 尿素を含む上記の緩衝液で洗浄後、酸性蛋白分解酵素阻害剤

（ペプスタチン 5 μg/ml, ロイペプチン 10 μg/ml）を含む0.5 M 酢酸で尿素を除いた。これらの前処理を終えた胎盤組織（湿重量約200g）を2 lの0.5 M 酢酸に懸濁し、組織湿重量1gあたり5mgのペプシン（1:60000, Sigma Chemical Co., Ltd., St Louis, MO）を加え、24時間抽出した。抽出後、遠心（10000 g, 1時間）により上清を分離した。この抽出操作を2回行ない、計4 lの抽出上清を得た。上清のペプシンを不活性化するために、5 Nの水酸化ナトリウムを加え上清のpHを8とし、室温で24時間放置したところ、ゲルが形成された。遠心（10000 g, 1時間）により、ゲルと上清を分離した。ゲルをI型およびIII型コラーゲン調整の出発材料とし、上清をIV型およびV型コラーゲン調整の出発材料とした²⁵⁾。I型コラーゲンは永井らの方法²⁶⁾に従って単離した。III型コラーゲンはChandraRajanのdenaturation and renaturation法²⁷⁾により単離した。以上の分画操作をまとめて図1に示した。IV型およびV型コラーゲンはRhodesらの方法²⁸⁾およびSanoらの方法²⁹⁾の一部を改良した方法でそれぞれ単離した（図2）。

型別コラーゲン調整の各段階において、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）により各型コラーゲンの同定を行った³⁰⁾³¹⁾。特に、III型コラーゲンの同定にはHayashiらの電気泳動の系に3 M 尿素を加える方法³²⁾およびSykesらの途中還元法³³⁾を併用した。単離した各型コラーゲンについて、DEAE-セルロースクロマトグラフィーを行ない、非コラーゲ

hematoxyline and eosin ; NEM, N-ethylmaleimide ; PBS, phosphate buffered saline ; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride ; PTAH, phosphotungstic acid hematoxyline ; SD, Sprague-Dawley ; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

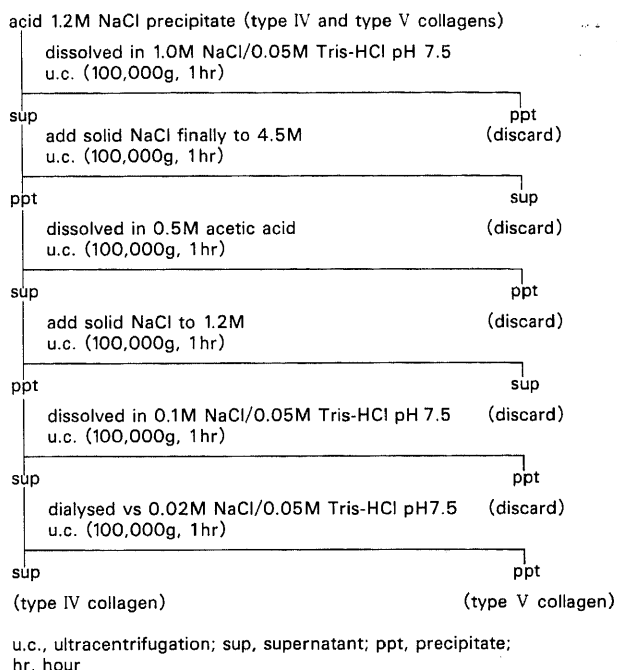


Fig. 2. The isolation procedure of type IV collagen and type V collagen.

ン蛋白質を除去して精製標品を得た³⁴⁾。精製した各型コラーゲンを細菌性コラーゲナーゼで消化した後、SDS-PAGEにより解析し、非コラーゲン蛋白質の有無を確認した。ここで用いたコラーゲナーゼは、市販の *Chlostridium histolyticum* コラーゲナーゼ (天野製薬, 名古屋) をゲルクロマトグラフィーにかけて再精製し、コラーゲナーゼ以外の非特異的のプロテアーゼ活性がないことを確認したものである³⁵⁾。実際には、5 mM 酢酸で 0.2% になるように溶解した各型コラーゲン溶液 100 μ l に対して、6.25 mM 塩化カルシウムおよび 15.6 mM NEM を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.6 に 0.25 mg/ml の濃度に溶解した細菌性コラーゲナーゼ溶液を 100 μ l 加え、さらに 1 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.6 を用いて中和し、37°C で 90 分間消化した。消化後、5 分間煮沸してコラーゲナーゼを不活性化し、凍結乾燥して電気泳動用の試料とした。この実験系から、細菌性コラーゲナーゼだけを除外した系と、コラーゲンだけを除外した系を、それぞれ対照とした。

精製した各型コラーゲンは、5 mM 酢酸に対して十分に透析し凍結乾燥後、-20°C にて保存した。

II. 型特異的抗ヒトコラーゲン抗体の作製

精製した各型コラーゲンを各型につき 5 匹の SD ラット (7 週齢, オス) に免疫し、抗血清を得た。初回感作量および追加感作量はともにラット 1 匹あた

り、I 型、III 型および V 型コラーゲンは 1 mg, IV 型コラーゲンは 250 μ g とした。血清抗体価は ELISA 法により測定した³⁶⁾。各型の抗血清から、アフィニティークロマトグラフィーを用いて型特異的抗ヒトコラーゲン抗体 (抗コラーゲン抗体) を精製した³⁷⁾³⁸⁾。すなわち、各型の抗血清から、他型コラーゲンをそれぞれ結合させた活性化 CH-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Co., Ltd., Uppsala, Sweden) カラムを用いて交叉反応する成分を除いた後に、同型コラーゲンを結合させたカラムにかけて、それぞれの型特異的抗体を精製した。精製した抗コラーゲン抗体の型特異性は、表 1 に示した条件で ELISA 法の inhibition test³⁹⁾ により検定した。なお、ELISA 法および ELISA 法による inhibition test においては、二次抗体として 1000 倍希釈した ALP 標識ヤギ抗ラット IgG (Cappel Laboratories Inc., Cochranville, PA) を用いた。

III. 対 象

11 例の乳癌および 3 例の良性乳腺病変 (乳腺症 2 例, 線維腺腫 1 例) を、組織学的ならびに免疫組織化学的に検索した (表 2)。組織学的には、10% 緩衝ホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、H. E., azan, EVG, Ag, PTAH の各染色を施行した。乳癌の組織型は、乳癌取扱規約⁴⁰⁾に従って分類した。また、間質の状態により、硬癌とそれ以外の癌 (非硬癌) に大別し

Table 1. Experimental conditions of ELISA inhibition tests

1st antibodies, rat anti-collagen antibodies ; 2nd antibody,
rabbit anti-rat IgG ; hr, hour

Table 2. The cases examined histologically and immunohistochemically

case	Age	Sex	Site	Histological diagnosis	Condition of stroma
1	63	F	R	Invasive scirrhous carcinoma	scirrhous
2	38	F	R	Invasive scirrhous carcinoma	scirrhous
3	45	F	R	Invasive lobular carcinoma	scirrhous
4	53	F	L	Invasive lobular carcinoma	partially scirrhous
5	36	F	L	Metastatic duct carcinoma	partially scirrhous
6	38	F	R	Invasive solid-tubular carcinoma	partially scirrhous
7	62	F	R	Invasive papillotubular carcinoma	non-scirrhous
8	66	F	R	Invasive tubular carcinoma	non-scirrhous
9	62	F	L	Invasive solid-tubular carcinoma	non-scirrhous
10	47	F	R	Invasive papillotubular carcinoma	non-scirrhous
11	51	F	L	Invasive solid-tubular carcinoma	non-scirrhous
12	42	F	R	Mastopathy	
13	38	F	R	Mastopathy (fibrocystic disease)	
14	54	F	L	Fibroadenoma (pericanalicular type)	

F, female ; R, right ; L, left

た。

IV. 免疫組織学的検索

上記の症例より、手術時あるいは生検の際に、迅速診断のために得られた乳腺組織の一部を液体チッ素で凍結した後、クリオスタット (Miles Laboratories Inc., Naperville, IL) で厚さ 3 μ m の凍結切片を作製し、間接蛍光抗体法により I 型、III 型、IV 型および V 型コラーゲンならびにラミニンの局在を検索した³⁸⁾⁴¹⁾。凍結切片を 10 分間アセトン固定し、冷 PBS で 10 分間、3 回洗浄した後、非特異的応答を抑制するために、10% に希釈した正常ヤギ血清 (Dako-immuno-

globulins a/s, Denmark) あるいは正常ヒツジ血清 (Dako Corporation, Santa Barbara, CA) を室温で 30 分間作用させた。引き続き、抗コラーゲン抗体あるいは抗ヒトラミンモノクローナル抗体 (抗ラミニン抗体, Behring Diagnostics, La Jolla, CA, Lot 507721) を 4°C で一晩反応させた。抗 I 型、III 型および V 型コラーゲン抗体は 10 倍に、抗 IV 型コラーゲン抗体は 20 倍に、抗ラミニン抗体は 100 倍に、それぞれ希釈して用いた。次に、冷 PBS で 10 分間、3 回洗浄した後、FITC 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体あるいは FITC 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体 (いずれも

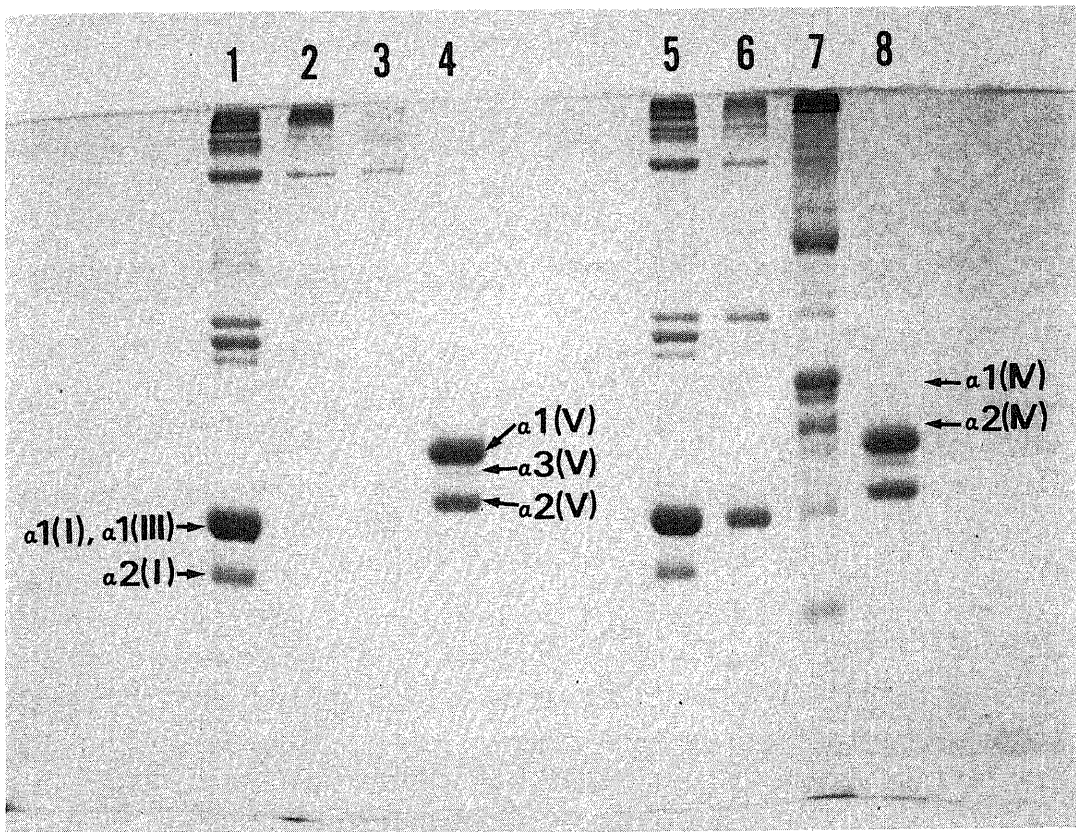


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of type I, III, IV, and V collagens isolated from human placenta. Each type of collagen was dissolved in loading buffer and applied on 3% stacking gel and 5% running gel, with or without reduction. Lanes 1 and 5, type I collagen; lanes 2 and 6, type III collagen; lanes 3 and 7, type IV collagen; lanes 4 and 8, type V collagen. Lanes 1 to 4 were electrophoresed without reduction, and lanes 5 to 8 were done with reduction by 0.1 M dithiothreitol. Arrows indicate the electrophoretic positions of α chains of collagen types.

Cappel Laboratories Inc., Cochranville, PA) を、PBS でそれぞれ 10 倍および 20 倍に希釈して、室温で 1 時間反応させた。冷 PBS で 10 分間、3 回洗浄した後、90% グリセリンで封入し、蛍光顕微鏡 (Olympus, model AH2-FL) により型別コラーゲンおよびラミニンの局在を観察した。

なお、対照として、抗コラーゲン抗体および抗ラミニン抗体のかわりに、正常ラット IgG および正常マウス IgG (いずれも Cappel Laboratories Inc., Cochranville, PA) をそれぞれ反応させた。また、正常乳腺組織は症例 6, 10 および 11 の非病変部より採取し、乳癌あるいは良性乳腺病変の対照として用いた。

成 績

I. 型別コラーゲンの性状

ヒト胎盤から単離、精製された各型コラーゲンの SDS-PAGE のパターンを図 3 に示した。各型コラーゲン分子の α 鎖に注目してみると、I 型コラーゲンは $\alpha 1(I)$ および $\alpha 2(I)$ 鎖から、III 型コラーゲンは $\alpha 1(III)$ 鎖のみから、IV 型コラーゲンは $\alpha 1(IV)$ および $\alpha 2(IV)$ 鎖から、V 型コラーゲンは $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ および $\alpha 3(V)$ 鎖からそれぞれ構成されており、この結果は従来の報告¹⁵⁾⁴²⁾に一致していた。IV 型コラーゲンはその分子内にペプシン感受性部分が存在するため、電気泳動上では、 $\alpha 1(IV)$ 鎖および $\alpha 2(IV)$ 鎖以外に種々の分子量の α 鎖の断片が認められた。DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより精製した各型コラーゲンを細菌性コラゲナーゼで消化後、SDS-PAGE で解析した結果、いずれの型のコラーゲン画分においても、SDS-PAGE で認められたすべてのバン

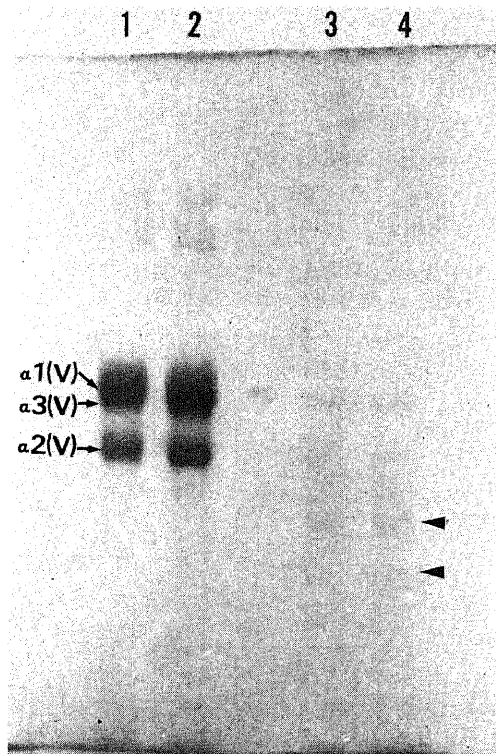


Fig. 4. SDS-PAGE pattern of purified type V collagen with or without bacterial collagenase digestion. Lanes 1 and 2, type V collagen without collagenase digestion; lanes 3 and 4, type V collagen after collagenase digestion. Lanes 1 and 3 were electrophoresed under nonreduced condition, and lanes 2 and 4 were done under reduced condition. Arrows show the electrophoretic position of each α chain of type V collagen, and arrow heads indicate that of bacterial collagenase derived from *Clostridium histolyticum*.

ドが消失した。その1例として図4に、V型コラーゲンに関して、細菌性コラーゲナーゼ消化前後のSDS-PAGEのパターンを示した。

II. 抗コラーゲン抗体の型特異性

アフィニティクロマトグラフィーにより精製した抗コラーゲン抗体に対する、ELISA法によるinhibition testの結果を図5に示した。それぞれの型別抗コラーゲン抗体の反応は同型コラーゲンにより選択的に抑制され、他型のコラーゲンでは1000 ng/ml以上の濃度のものを作用させても抑制されなかった。この結果より、精製した抗コラーゲン抗体の型特異性が確認された。

III. 乳癌および良性乳腺病変の病理組織像

今回検索した11例の乳癌ならびに3例の良性乳腺病変の病理組織学的診断を表2に示した。乳癌はその間質の状態により、硬癌とそれ以外の癌（非硬癌）に大別した。硬癌の組織像を呈するものは11例のうち、浸潤性硬癌2例と浸潤性小葉癌1例であった。非硬癌8例のうち、3例（症例4、5および6）が部分的に硬癌の像を示していた。硬癌では密な線維性結合組織の増生が著明で、腺管周囲、血管周囲および線維性結合組織内に弾性線維の増生を伴っていた。結合組織線維間には紡錘形の線維芽細胞様細胞が散在していた。良性乳腺病変の内訳は、線維腺腫1例と乳腺症（fibrocystic disease）2例で、間質の線維化は認められたが、弾性線維の増生は認められないかあるいは軽度であった。

IV. 型別コラーゲンおよびラミニンの局在

1. 正常乳腺および良性乳腺病変

正常の乳腺（図6a）においては、I型およびIII型コラーゲンは小葉間ならびに乳管周囲の線維性結合組織に沿って、びまん性に分布していた。I型およびIII型コラーゲンの反応は小葉内の粗な間質にも認められたが、小葉間の反応に比べて染色性は弱かった（図6b, c）。I型およびIII型コラーゲンの分布には差は認められなかったが、III型コラーゲンはI型コラーゲンよりもやや繊細に染色された。IV型コラーゲンとラミニンは腺房、乳管、血管、脂肪組織などの基底膜領域に沿って線状に分布し、それ以外の間質には反応しなかった（図6d, f）。V型コラーゲンは小葉内の粗な間質にわずかに染まったが、それ以外の間質および基底膜領域には染色されなかった（図6e）。

線維腺腫および乳腺症（fibrocystic disease）における型別コラーゲンとラミニンの分布は、基本的には、正常乳腺組織における分布と同様であった。すなわち、I型およびIII型コラーゲンは間質の線維性組織に分布し、IV型コラーゲンとラミニンは基底膜領域に局在していた。V型コラーゲンは一部の腺管の周囲にわずかに染色されるのみであった。

2. 乳癌（硬癌、非硬癌）

硬癌（図7a）においては、I型およびIII型コラーゲンは間質の太い結合組織線維に沿って分布し、III型コラーゲンはI型コラーゲンに比べて繊細に染色された（図7b, c）。IV型コラーゲンとラミニンは癌細胞周囲に不連続線状に分布し、また、間質の太い線維の辺縁に沿って、癌細胞の有無にかかわらず線状に分布しているのが認められた（図7d, f）。V型コラーゲンは間質の線維に沿って陽性を示し、特に線維の辺縁に強く染色された（図7e）。

非硬癌（図8a）では、I型およびIII型コラーゲンは

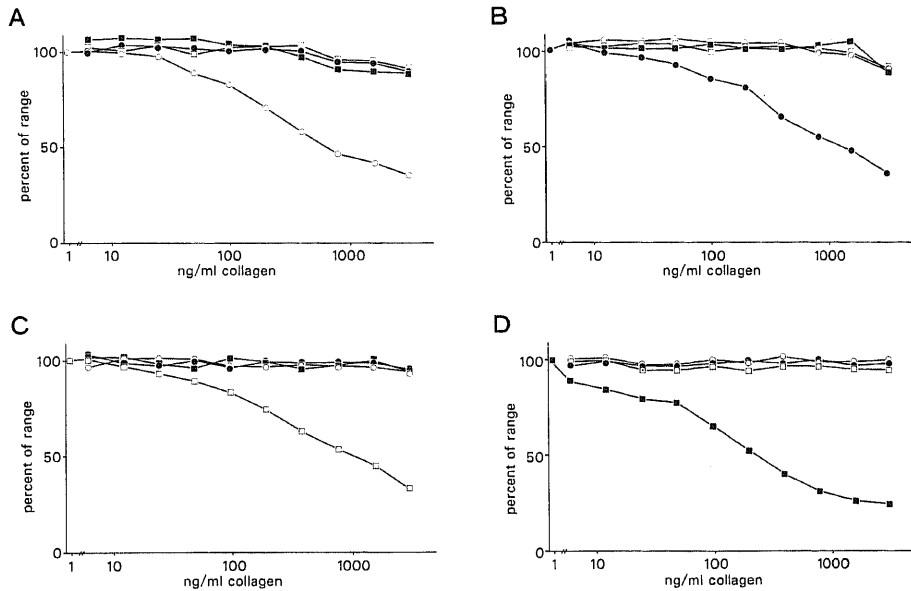


Fig. 5. ELISA inhibition tests of the antibodies to type I (A), type III (B), type IV (C) and type V (D) collagens. The experimental condition was referred to table 1. The vertical axis shows % optimal density compared with that of noninhibited condition, and the transverse one shows the concentration of collagen (antigen) used for inhibition. Open circle, closed circle, open square represent inhibition by type I, type III, type IV and type V collagen, respectively.

間質結合組織にびまん性に分布していた (図 8b, c). V型コラーゲンも同様に間質に分布していたが (図 8e), その染色性は, I型コラーゲンおよびIII型コラーゲンの反応や硬癌におけるV型コラーゲンの反応に比べて, きわめて微弱であった. 浸潤性小葉癌で硬癌の像を示さない部分では, I型, III型およびV型コラーゲンは癌細胞巢を不規則に細分化するように分布していた. 非硬癌では, IV型コラーゲンとラミニンは癌細胞巢の辺縁に沿ってほぼ線状に分布していたが, ところどころで連続性が途切れていることがあった (図 8d,f). 非硬癌の場合には硬癌と異なり, 癌巣周囲以外の線維束間には明らかな陽性所見は認められなかった. 非硬癌に分類されたものの中でも, 一部で硬癌の組織像を呈するところがみられ, そのような部位における型別コラーゲンとラミニンの分布は硬癌における分布と同様であった.

検索した症例において, 癌細胞を含めた上皮細胞は, 抗コラーゲン抗体あるいは抗ラミニン抗体のいずれによっても染色されなかった.

なお, 対照として, 抗コラーゲン抗体あるいは抗ラミニン抗体のかわりに, それぞれ正常ラット IgG あるいは正常マウス IgG を反応させたが, いずれも明らか

な陽性所見は認められなかった.

考 察

I. 型特異的抗コラーゲン抗体作製上の問題点

コラーゲン分子は, 基本的には, α 鎖と呼ばれるポリペプチド鎖 3本の3重らせん構造 (ヘリックス) により構成されている. その α 鎖の一次構造の違いに基いて, 現在までに, 遺伝的に異なる少なくとも 11種類の分子種 (I型~X型およびK型) が存在することが知られている^{15)~22)}. このうち, I型~V型コラーゲンに関してはその生化学的性質, 機能および組織分布がかなり解明されてきている^{15)22)~24)41)}.

I型, II型およびIII型コラーゲンは総称して間質型コラーゲン (interstitial collagen) と呼ばれ, I型およびIII型コラーゲンはともに間質の結合組織に広く分布し, II型コラーゲンは軟骨基質と眼の硝子体に局在している²²⁾²⁴⁾⁴¹⁾. I型コラーゲンは $\alpha 1$ (I) および $\alpha 2$ (I) 鎖から, II型コラーゲンは $\alpha 1$ (II) 鎖のみから, III型コラーゲンは $\alpha 1$ (III) 鎖のみからそれぞれ構成されている. IV型コラーゲンは別名基底膜コラーゲンと呼ばれ, その局在は基底膜に限られている²²⁾²⁴⁾⁴¹⁾. IV型コラーゲン分子は $\alpha 1$ (IV) および $\alpha 2$ (IV) 鎖か

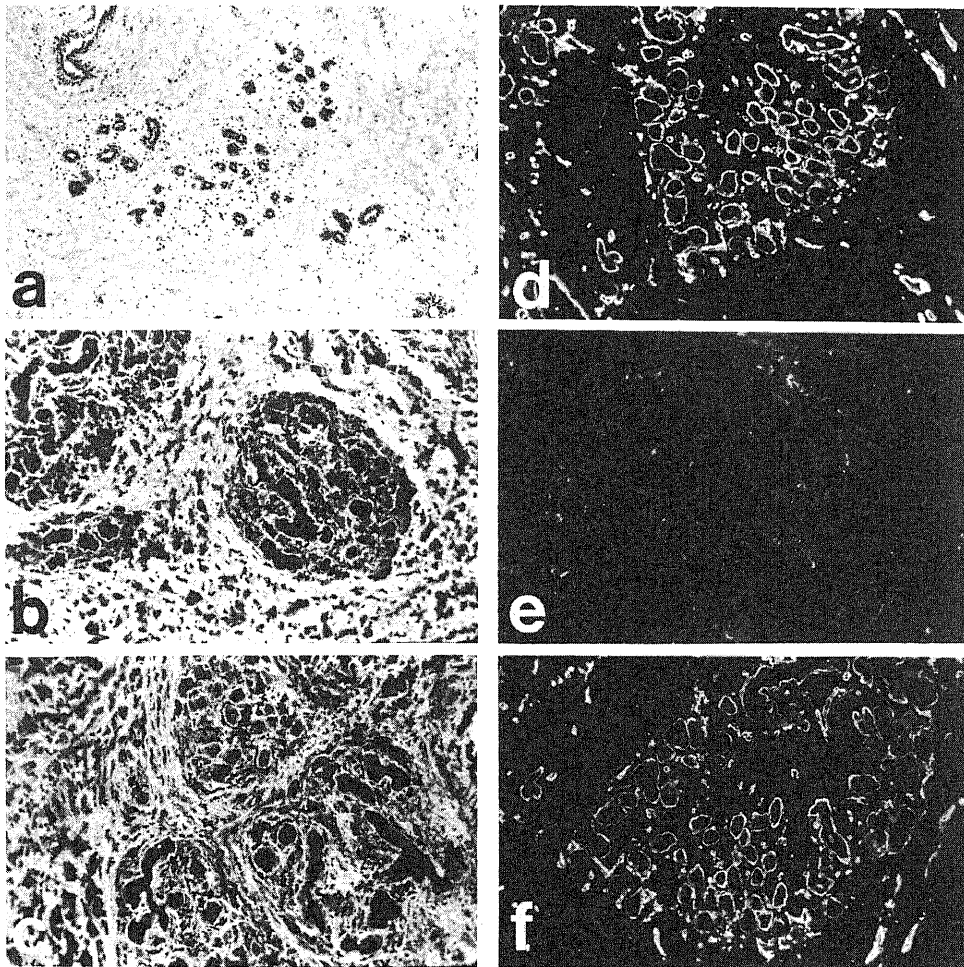


Fig. 6. Unaffected breast tissue. Histological representation (a) and immunofluorescence staining patterns of type I collagen (b), type III collagen (c), type IV collagen (d), type V collagen (e), and laminin (f). (a), H. E., $\times 25$; (b) to (f), $\times 50$.

ら構成されている。通常、コラーゲン分子のヘリックス部分はペプシンに対して低抗性を示すが、IV型コラーゲンには分子の3本鎖ヘリックスおよびその末端部分に、ペプシンに感受性を示す非ヘリックス部分が存在している。このため、ペプシン消化により得られたIV型コラーゲンには、 $\alpha 1$ (IV) および $\alpha 2$ (IV) 鎖以外に、ペプシン消化の程度に応じて種々の分子量の α 鎖の断片が認められる⁴³⁾。V型コラーゲンは $\alpha 1$ (V)、 $\alpha 2$ (V) および $\alpha 3$ (V) 鎖から構成されている。以前は、V型コラーゲンは基底膜に局在していると報告されたが⁴⁴⁾、現在は、間質⁴⁵⁾⁴⁶⁾あるいは間質と基底膜との間に介在していることが示されている⁴⁷⁾。

型特異的抗コラーゲン抗体を作製するためには、抗原として用いる型別コラーゲンの純化、精製が重要で

ある。今回、ヒト胎盤から単離、精製して得られた型別コラーゲンは、その SDS-PAGE のパターンから示されるように、少なくとも電気泳動上では、それぞれの型のコラーゲン画分には他型コラーゲンの混在はないものと考えられた (図3)。また、ペプシン消化を受けているため、I型、III型およびV型コラーゲンはいずれも主にヘリックス部分が抽出されていることになる。IV型コラーゲンの画分には、 $\alpha 1$ (IV) および $\alpha 2$ (IV) 鎖がその断片とともに認められ、 α 鎖のヘリックス部分の途中に介在する非ヘリックス部分が比較的よく保たれているものと考えられる。このことから、I型、III型およびV型コラーゲンに対する抗体は主としてヘリックス部分に対する抗体であり、一方、IV型コラーゲンに対する抗体はヘリックス部分に加えて非ヘ

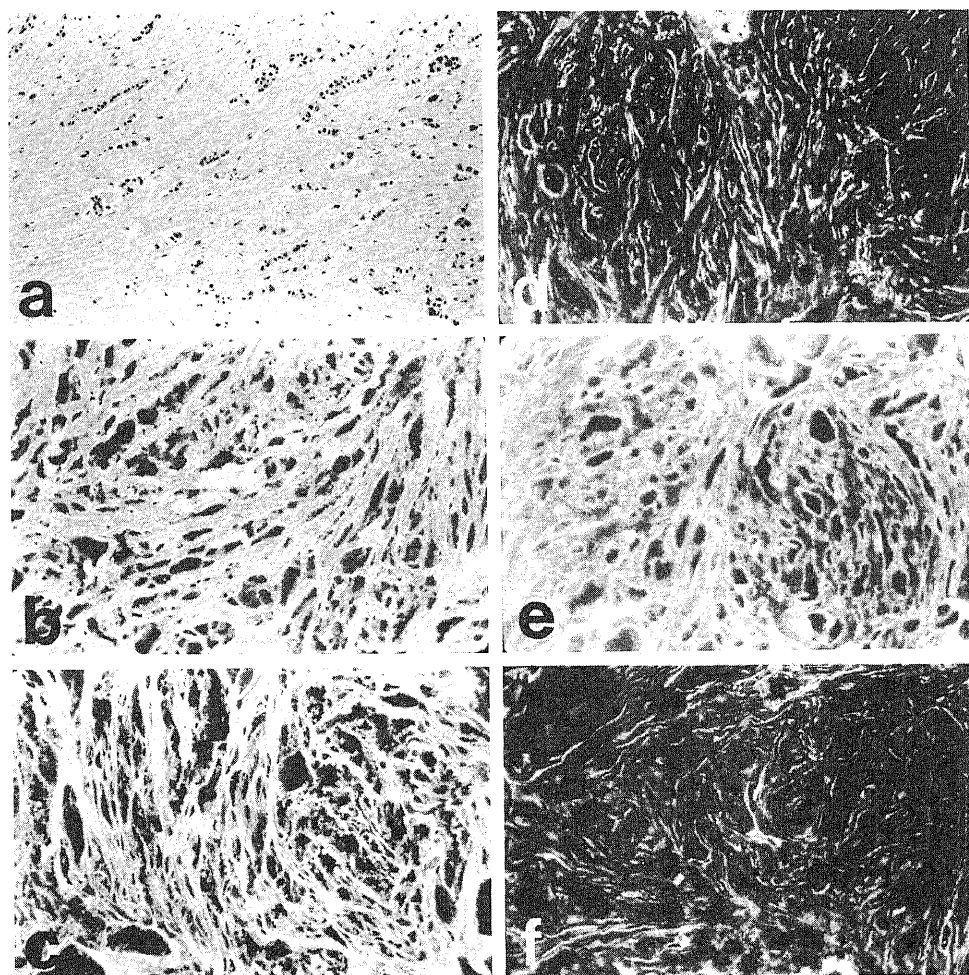


Fig. 7. Scirrhous carcinoma of the breast. Histological representation (a) and immunofluorescence staining patterns of type I collagen (b), type III collagen (c), type IV collagen (d), type V collagen (e), and laminin (f). (a), H. E., $\times 40$; (b) to (f), $\times 100$.

リックス部分も認識していることが強く示唆される。未変性コラーゲン分子の抗原決定基は、ヘリックス部分とそのCおよびN側両末端の非ヘリックス部分とに大別され、抗原性は非ヘリックス部分の方が高いとされている³⁷⁾⁵⁶⁾。今回、IV型コラーゲンに対する抗体作製にあたって、他型コラーゲンに比べてより少量の感作量ですみ、他型と同等あるいはそれ以上の titer を示す抗体が得られたのはこのためである。

抗コラーゲン抗体を作製するにあたって、本研究では次の2点に最も注意を払った。第一に、各型コラーゲンは、基本的には α 鎖の3本鎖ヘリックスからなり、そのアミノ酸組成が極めて類似しているため、動物に免疫して得られた抗血清には、各型コラーゲンと

の間にしばしば交叉反応がみられるということである³⁷⁾⁵⁶⁾。第二に、抗原にコラーゲン以外の蛋白質が混入していた場合、同時に非コラーゲン蛋白質に対する抗体ができてしまい、抗コラーゲン抗体を精製する際に、これらの成分を除くことが非常に困難になるという問題である。

第一の問題点を解決するために、本研究ではアフィニティクロマトグラフィーにより抗血清から型特異的抗体を精製する方法を用いた。すなわち、各型コラーゲンに対する抗血清を、他型コラーゲンを結合させたCH-Sepharose 4Bカラムに通じて交叉反応する成分を除き、ELISA法により交叉反応がないことを確認した後、同型コラーゲンを結合させたカラムに吸着させ

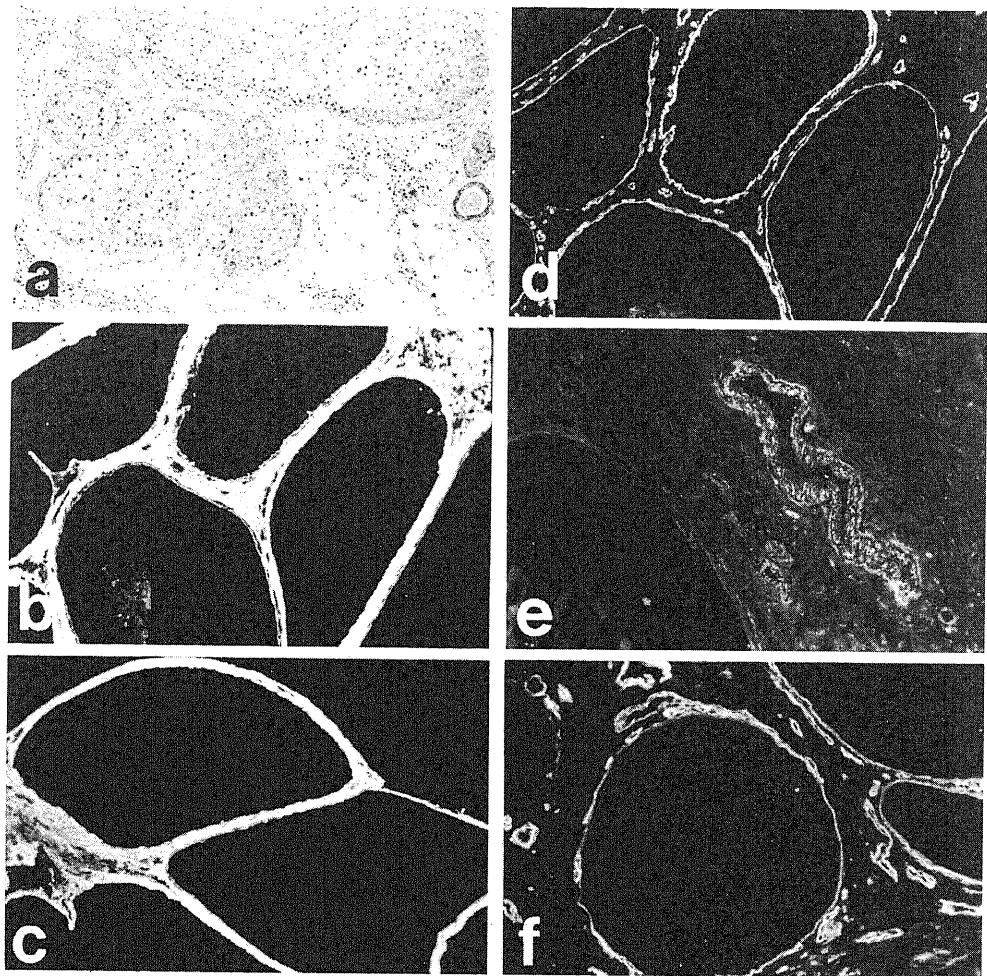


Fig. 8. Solid-tubular carcinoma of the breast. Histological representation (a) and immunofluorescence staining patterns of type I collagen (b), type III collagen (c), type IV collagen (d), type V collagen (e), and laminin (f). (a), H. E., $\times 25$; (b) to (e), $\times 50$; (f), $\times 100$.

て、それぞれの型特異的抗体を精製した。さらに、ELISA法を用いた inhibition test を行ない型特異性を確認した。ELISA法の inhibition test を行った際に、抗I型、III型およびV型コラーゲン抗体は400倍に稀釈し、抗IV型コラーゲン抗体は100倍に稀釈して用いたが、いずれも交叉反応はみられなかった。したがって、蛍光抗体法においても、各型コラーゲンの間の交叉反応は無視できると考えられた。

次に問題となった非コラーゲン蛋白はDEAE・セルロースクロマトグラフィーにより除去して、型別コラーゲン画分を精製した³⁴⁾。このコラーゲンを非特異的プロテアーゼ活性のない細菌性コラゲナーゼ³⁵⁾で消化後、SDS-PAGEで分析した結果、コラゲナーゼ消

化前に認められたすべてのバンドが消失した。したがって、精製した抗コラーゲン抗体はコラーゲン以外の組織成分には交叉反応しないと考えられた。

II. 乳癌における型別コラーゲンおよびラミニンの局在

一般に、硬癌間質の成分はコラーゲンが主体で^{3)~7)}、これにエラスチン^{5)48)~53)}や他の糖蛋白質がさまざまな程度に混っているものである。硬癌間質の成因については、既存の間質の虚脱によるとする説³⁾や、癌細胞自身が過剰の間質成分を産生するという説⁴⁾⁵⁾がこれまで提唱されてきた。近年、Barskyら⁷⁾は、抗コラーゲン抗体を用いて乳癌間質を免疫組織化学的に検索し、硬癌間質の主成分はI型コラーゲンであり、さらにV型

コラーゲンが増加することが硬癌の特徴であることを指摘した。Yamamoto ら¹⁰⁾や Nagai ら¹¹⁾は、乳腺硬癌と同様の組織像を呈する胃硬癌の間質を抗コラーゲン抗体を用いて同様に検索し、硬癌間質は主に I 型および III 型コラーゲンから構成されていることを示した。また、著明な間質の増生を伴う肺の癒痕癌においても、I 型および III 型コラーゲンの他に V 型コラーゲンが出現すると報告されている⁸⁾⁹⁾。いずれの報告においても、癌細胞には I 型、III 型あるいは V 型コラーゲンは証明されていないので、癌細胞が過剰のコラーゲンを産生するという説は否定的である。硬癌間質の成因に関する培養系を用いた研究では、癌細胞による順化培地 (conditioned medium) が線維芽細胞の増殖とコラーゲンやエラスチンなどの間質成分の合成を促進するということが示されている^{11)~14)}。このようなことから、硬癌間質の成因は、間質細胞 (線維芽細胞) が癌細胞から何らかの刺激を受け、その結果として過剰のコラーゲンやエラスチンを産生するようになることであろうと推定されている。

今回、抗コラーゲン抗体と抗ラミニン抗体を用いて蛍光抗体法によりその局在を調べた結果、正常乳腺組織では、I 型および III 型コラーゲンは小葉間の線維性結合組織にびまん性に分布し、IV 型コラーゲンはラミニン⁵⁵⁾とともに基底膜に局在していた。V 型コラーゲンは小葉内の粗な間質にわずかに認められた。乳腺症や線維腺腫における型別コラーゲンとラミニンの分布は、基本的には、正常乳腺における分布とほぼ同様であった。正常乳腺および良性乳腺病変では、生化学的にも免疫組織化学的にも V 型コラーゲンはごくわずかしか認められないことが報告されており⁷⁾、今回の成績もそれに一致するものであった。

乳癌 11 例を同様に検索した結果、正常乳腺や良性乳腺病変に比較していくつの特徴がみられた。まず第一に、IV 型コラーゲンとラミニンは癌細胞巢辺縁の基底膜に相当する部分に沿って線状に分布していたが、癌が間質に浸潤しているようなところではその連続性が途切れていたことである。このような基底膜の断裂はこれまでも報告されており^{57)~60)}、癌細胞が分泌する酵素によって基底膜が分解されるためと考えられている^{61)~64)}。

第二の特徴は V 型コラーゲンの分布である。V 型コラーゲンは正常乳腺組織や良性乳腺病変にはごくわずかしか認められないのに対して、乳癌の場合、特に硬癌ではかなりびまん性に出現することである。また、硬癌の間質の中でも太い線維の辺縁により強い染色性を示していた。このような硬癌における V 型コラーゲンの増量は Barsky ら⁷⁾によって、また、肺の癒痕癌⁸⁾⁹⁾

においても報告されている所である。一方、動脈硬化⁶⁵⁾⁶⁶⁾、肥大型癒痕⁶⁷⁾、熱傷肉芽組織⁶⁸⁾⁶⁹⁾、肺線維症⁷⁰⁾などの悪性腫瘍以外に線維化をきたす病変部においても、V 型コラーゲンが増加することが知られている。V 型コラーゲンは *in vitro* で周期性をもった細線維を形成し、かつ、I 型コラーゲンの共存下で I 型コラーゲンとの間に hybrid fibril を形成することが証明されている⁷¹⁾⁷²⁾。したがって、V 型コラーゲンは悪性腫瘍、特に硬癌の間質に特異的に出現するものではなく、進行性の線維化の過程に深く関与するコラーゲンであることが示唆される。

第三の特徴は、硬癌において IV 型コラーゲンとラミニンが、一部癌細胞とは無関係に太い線維の辺縁に沿って線状あるいは小斑状に局在していたことである。このような基底膜成分の異常分布は、既に Nagai ら¹¹⁾が胃の硬癌において観察し硬癌の特徴の一つであろうと主張している所見であるが、その異常分布の解釈は難しい。この異常分布を示す基底膜成分の由来としてまず考えられるのは、浸潤の速い癌細胞によって形成された基底膜が癌細胞の遊走により残り残されたものであるという可能性である。次に、これは線維化に先立って新生するとされる毛細血管の基底膜の遺残であるのかもしれない。しかし、これらとは別の考えとして、この異常基底膜成分は、硬癌の間質にしばしば出現するといわれる筋線維芽細胞の基底膜様構造を表わしているのかもしれない。IV 型コラーゲンとラミニンが主に間質の太い線維の辺縁に沿って局在していたという今回の所見から考えると、この異常な基底膜成分は硬癌間質の筋線維芽細胞に由来するということが最も妥当のように思われるが、免疫電顕の手法による証明を待たねばならないだろう。

硬癌間質の形成機序については、既に述べたように、癌細胞と間質および間質細胞との相互作用の結果であるという見方が強い^{8)~11)}。今回の蛍光抗体法による染色の結果、コラーゲンやラミニンは癌細胞には染まらなかった。乳癌の間質には I 型および III 型コラーゲンに加えて V 型コラーゲンが染色され、特に硬癌の間質により著明な染色性を示した。また、V 型コラーゲンは硬癌間質の太い線維の辺縁に局在していた。以上の所見は、硬癌間質が常在する間質細胞の過剰反応によって形成されたものであるという考えを支持している。一方、基底膜の主要成分である IV 型コラーゲンとラミニンが硬癌間質の太い線維の辺縁に線状に局在していた。硬癌の間質に多いとされる筋線維芽細胞は、電顕的には平滑筋細胞と線維芽細胞の両者の特徴をあわせもった細胞で、細胞周囲に基底膜様構造を備えている⁸⁾⁷⁵⁾⁷⁶⁾。V 型コラーゲンは *in vivo* では平滑筋細胞

の周囲に分布し、培養平滑筋細胞がI型、III型コラーゲンの他にV型コラーゲンを産生することが示されている¹⁵⁾²³⁾で、筋線維芽細胞もある条件下ではV型コラーゲンを過剰に産生し得るものと思われる。以上のことから、硬癌の間質は、癌細胞と間質の線維芽細胞および筋線維芽細胞との間の相互作用の結果、間質細胞によって主に形成されたものと考えられる。

結 論

正常乳腺組織、良性乳腺病変および乳癌の間質における型別コラーゲン（I型、III型、IV型およびV型）ならびにラミニンの分布を、型特異的抗コラーゲン抗体と抗ラミニン抗体を用いて蛍光抗体法により観察し、硬癌の間質の成因を検討した。

1. ヒト胎盤からペプシン消化にてコラーゲンを抽出し、塩析法によりI型、III型、IV型およびV型コラーゲンを単離した。ついで、DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより精製した。各型コラーゲンの純度はSDS-PAGEと細菌性コラゲナーゼ消化試験を併用して確認した。

2. 型別コラーゲンをSDラットに免疫して得られた抗血清から、アフィニティクロマトグラフィーで型特異的抗コラーゲン抗体を精製した。各抗体の型特異性はELISA法のinhibition testにより検定した。

3. 正常乳腺組織では、I型およびIII型コラーゲンは主に小葉間の間質に分布し、IV型コラーゲンとラミニンは基底膜領域に局限して線状に局在していた。V型コラーゲンは小葉内の粗な結合組織にわずかに認められるのみであった。乳腺症および線維腺腫における型別コラーゲンとラミニンの分布も、基本的には同様であった。

4. 乳癌では、I型およびIII型コラーゲンは癌細胞巣周囲の間質に分布していた。IV型コラーゲンとラミニンは癌細胞巣の基底膜に相当する部分にほぼ線状に存在するが、一部でその連続性が途切れていた。一方、硬癌の間質では、これらの基底膜成分は太い線維の辺縁に沿って局在し、癌細胞巣とは無関係であった。V型コラーゲンは間質にびまん性に分布し、その染色性は非硬癌に比べて硬癌により著明であった。また、間質の太い線維の辺縁の方が強い染色性を示した。

5. 検索した全例において、抗コラーゲン抗体も抗ラミニン抗体も癌細胞を含めた上皮細胞には反応しなかった。

以上の所見から、乳腺硬癌の成因は主として間質の反応性増殖によるもので、I型およびIII型コラーゲンに加えてV型コラーゲンが密な線維性間質の形成に深く関与していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに際し、御指導、御校閲を賜りました中西功夫教授に深く感謝の意を表します。抗コラーゲン抗体の作製にあたり親身なる御教示をいただきました、東京医科歯科大学難治疾患研究所永井裕教授に心より感謝致します。また、貴重な材料を提供していただきました、金沢大学がん研究所外科磨伊正義教授に深謝致します。本研究遂行に際して御助言、御協力をいただきました教室員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Adair, F., Berg, J., Joubert, L. & Robbins, G. F.: Long-term followup of breast cancer patients: The 30-year report. *Cancer*, **33**, 1145-1150 (1974).
- 2) 北岡久三, 三輪 潔: スキルスの予後. *臨床成人病*, **7**, 1835-1839 (1977).
- 3) Jackson, J. G. & Orr, J. W.: The ducts of carcinomatous breasts, with particular reference to connective-tissue changes. *J. Path. Bact.*, **74**, 265-273 (1957).
- 4) Al-Adnani, M. S., Kirrane, J. A. & McGee, J. O'D.: Inappropriate production of collagen and prolyl hydroxylase by human breast cancer cells *in vivo*. *Br. J. Cancer*, **31**, 653-660 (1975).
- 5) Douglas, J. G. & Shivas, A. A.: The origins of elastica in breast carcinoma. *J. R. Coll. Surg. Edinb.*, **19**, 89-93 (1974).
- 6) Tremblay, G.: Stromal aspects of breast carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.*, **31**, 248-260 (1979).
- 7) Barsky, S. H., Rao, C. N., Grotendorst, G. R. & Liotta, L. A.: Increased content of type V collagen in desmoplasia of human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.*, **108**, 276-283 (1982).
- 8) Madri, J. A. & Carter, D.: Scar cancers of the lung: Origin and significance. *Hum. Pathol.*, **15**, 625-631 (1984).
- 9) El-Torky, M., Giltman, L. I. & Dabbous, M.: Collagens in scar carcinoma of the lung. *Am. J. Pathol.*, **121**, 322-326 (1985).
- 10) Yamamoto, M., Sumiyoshi, H., Nakagami, K., Taniyama, K. & Tahara, E.: Distribution of collagen types I and III and basal lamina in human gastric carcinoma: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Arch. A.*, **403**, 313-322 (1984).
- 11) Nagai, Y., Sunada, H., Sano, J., Onodera, S., Arai, K., Konomi, H., Minamoto, T., Hata, R.,

- Hori, H., Nakanishi, I., Kitaoka, H. & Sakamoto, G.** : Biochemical and immunohistochemical studies on the scirrhous carcinoma of human stomach. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **460**, 321-332 (1985).
- 12) **Vlodavsky, I., Lui, G. M. & Gospodarowicz, D.** : Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix versus plastic. *Cell*, **19**, 607-616 (1980).
- 13) **Kao, R. T., Hall, J., Engel, L. & Stern, R.** : The matrix of human breast tumor cells is mitogenic for fibroblasts. *Am. J. Pathol.*, **115**, 109-116 (1984).
- 14) **Kao, R. T., Hall, J. & Stern, R.** : Collagen and elastin synthesis in human stroma and breast carcinoma cell lines: Modulation by the extracellular matrix. *Connect. Tissue Res.*, **14**, 245-255 (1986).
- 15) **Bornstein, P. & Sage, H.** : Structurally distinct collagen types. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 957-1003 (1980).
- 16) **Jander, R., Rauterberg, J. & Glanville, R. W.** : Further characterization of the three polypeptide chains of bovine and human short-chain collagen (intima collagen). *Eur. J. Biochem.*, **133**, 39-46 (1983).
- 17) **Bentz, H., Morris, N. P., Murray, L. W., Sakai, L. Y., Hollister, D. W. & Burgeson, R. E.** : Isolation and partial characterization of a new human collagen with an extended triple-helical structural domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 3168-3172 (1983).
- 18) **Sage, H., Trüeb, B. & Bornstein, P.** : Biosynthetic and structural properties of endothelial cell type VIII collagen. *J. Biol. Chem.*, **258**, 13391-13401 (1983).
- 19) **Ninomiya, Y. & Olsen, B. R.** : Synthesis and characterization of cDNA encoding a cartilage-specific short collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 3014-3018 (1984).
- 20) **Schmid, T. M. & Linsenmayer, T. F.** : Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J. Cell Biol.*, **100**, 598-605 (1985).
- 21) **Burgeson, R. E., Hebda, P. A., Morris, N. P. & Hollister, D. W.** : Human cartilage collagens. Comparison of cartilage collagens with human type V collagen. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7852-7856 (1982).
- 22) 畑隆一郎: コラーゲン. その機能と代謝. 蛋白質核酸 酵素, **31**, 29-52 (1986).
- 23) **Minor, R. R.** : Collagen metabolism. A comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. *Am. J. Pathol.*, **98**, 226-280 (1980).
- 24) **von der Mark, K.** : Localization of collagen types in tissues. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, **9**, 265-324 (1981).
- 25) **Trelstad, R. L., Lawley, K. R., Hayashi, K., Ehrlich, H. P. & Silver, F. H.** : Type V collagen from the chick embryo: Biochemical, physicochemical and ultrastructural characteristics. *Collagen Rel. Res.*, **1**, 39-52 (1981).
- 26) 永井 裕, 砂田泰伸: 型別コラーゲンの調整. コラーゲン実験法 (永井 裕, 藤本大三郎編), 第1版, 31-50 頁, 講談社, 東京, 1985.
- 27) **ChandraRajan, J.** : Separation of type III collagen from type I collagen and pepsin by differential denaturation and renaturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 180-186 (1978).
- 28) **Rhodes, R. K. & Miller, E. J.** : Physicochemical characterization and molecular organization of the collagen A and B chains. *Biochemistry*, **17**, 3442-3448 (1978).
- 29) **Sano, J., Fujiwara, S., Sato, S., Ishizaki, M., Sugisaki, Y., Yajima, G. & Nagai, Y.** : AB (type V) and basement membrane (type IV) collagens in the bovine lung parenchyma: Electron microscopic localization by the peroxidase-labeled antibody method. *Biomed. Res.*, **2**, 20-29 (1981).
- 30) **Weber, K. & Osborn, M.** : Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. *In* H. Neurath, R. L. Hill & C. L. Boeder (eds.), *The Proteins*, vol 1., 3rd ed., p.179-223, Academic Press, Inc., New York, 1975.
- 31) 田中静子, 永井 裕: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法. コラーゲン実験法 (永井 裕, 藤本大三郎編), 第1版, 63-88 頁, 講談社, 東京, 1985.
- 32) **Hayashi, T. & Nagai, Y.** : Separation of the α chains of type I and III collagens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem.*, **86**, 453-459 (1979).
- 33) **Sykes, B., Puddle, B., Francis, M. & Smith, R.** : The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun., 72, 1472-1480 (1976).
- 34) Hoffmann, H.-P., Olsen, B. R., Chen, H.-T. & Prockop, D. J. : Segment-long-spacing aggregates and isolation of COOH-terminal peptides from type I procollagen. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 4304-4308 (1976).
- 35) Hata, R., Ninomiya, Y., Nagai, Y. & Tsukada, Y. : Biosynthesis of interstitial types of collagen by albumin-producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. Biochemistry, 19, 169-176 (1980).
- 36) Voller, A., Bidwell, D. E. & Bartlett, A. : Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull. W.H.O., 53, 55-65 (1976).
- 37) Furthmayr, H. : Immunization procedures, isolation by affinity chromatography, and serological and immunochemical characterization of collagen specific antibodies. In H. Furthmayr (ed.), Immunochemistry of the Extracellular Matrix, vol. I, 1st ed., p.143-178, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1982.
- 38) Konomi, H., Hori, H., Sano, J., Sunada, H., Hata, R., Fujiwara, S. & Nagai, Y. : Immunohistochemical localization of type I, II, III, and IV collagens in the lung. Acta Pathol. Jpn., 31, 601-610 (1981).
- 39) Rennard, S. I., Berg, R., Martin, G. R., Foidart, J. M. & Robey, P. G. : Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. Anal. Biochem., 104, 205-214 (1980).
- 40) 乳癌取扱規約 (乳癌研究会編). 第7版, 21-57頁, 金原出版, 東京, 1984.
- 41) Furthmayr, H. & von der Mark, K. : The use of antibodies to connective tissue proteins in studies on their localization in tissues. In H. Furthmayr (ed.), Immunochemistry of the Extracellular Matrix, vol. II, 1st ed., p.89-117, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1982.
- 42) Miller, E. J. & Rhodes, R. K. : Preparation and characterization of the different types of collagen. Methods Enzymol., 82, 33-64 (1982).
- 43) Schwartz, D., Chin-Quee, T. & Veis, A. : Characterization of bovine anterior-lens-capsule basement-membrane collagen. 1. Pepsin susceptibility, salt precipitation and thermal gelation: a property of non-collagen component integrity. Eur. J. Biochem., 103, 21-27 (1980).
- 44) Roll, F. J., Madri, J. A., Albert, J. & Furthmayr, H. : Codistribution of collagen types IV and AB₂ in basement membranes and mesangium of the kidney. J. Cell Biol., 85, 597-616 (1980).
- 45) Martinez-Hernandez A., Gay, S. & Miller, E. J. : Ultrastructural localization of type V collagen in rat kidney. J. Cell Biol., 92, 343-349 (1982).
- 46) Fitch, J. M., Gross, J., Mayne, R., Johnson-Wint, B. & Linsenmayer, T. F. : Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea : Monoclonal antibody studies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 2791-2795 (1984).
- 47) Konomi, H., Hayashi, T., Nakayasu, K. & Arima, M. : Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. Am. J. Pathol., 116, 417-426 (1984).
- 48) Tremblay, G. : Elastosis in tubular carcinoma of the breast. Arch. Pathol., 98, 302-307 (1974).
- 49) Tremblay, G. : Ultrastructure of elastosis in scirrhous carcinoma of the breast. Cancer, 37, 307-316 (1976).
- 50) Martinez-Hernandez, A., Francis, D. J. & Silverberg, S. G. : Elastosis and other stromal reactions in benign and malignant breast tissue. An ultrastructural study. Cancer, 40, 700-706 (1977).
- 51) Pietrow, D., Walski, M. & Groniowski, J. : Electron microscopic studies on elastic tissue in desmoplastic carcinoma of the breast. Acta Med. Pol., 18, 355-356 (1977).
- 52) Nakanishi, I., Moriizumi, T., Ooi, A., Oda, Y. & Kajikawa, K. : An ultrastructural study on periductal elastosis in human breast tumors. Acta Pathol. Jpn., 33, 761-772 (1983).
- 53) Parfrey, N. A. & Doyle, C. T. : Elastosis in benign and malignant breast disease. Hum. Pathol., 16, 674-676 (1985).
- 54) Nimni, M. E. : Collagen : Structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues. Sem. Arthr. Rheum., 13, 1-86 (1983).
- 55) Foidart, J. M., Bere, E. W. Jr., Yaar, M., Rennard, S. I., Gullino, M., Martin, G. R. & Katz, S. I. : Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. Lab. Invest., 42,

336-342 (1980).

- 56) **Furthmayr, H. & Timpl, R.** : Immunocytochemistry of collagens and procollagens. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, **7**, 61-99 (1976).
- 57) **Albrechtsen, R., Nielsen, M., Wewer, U., Engvall, E. & Ruoslahti, E.** : Basement membrane changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. *Cancer Res.*, **41**, 5076-5081 (1981).
- 58) **Barsky, S. H., Siegal, G. P., Jannotta, F. & Liotta, L. A.** : Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab. Invest.*, **49**, 140-147 (1983).
- 59) **De Martino, C., Bigotti, A. & Natali, P.G.** : Immunohistochemical localization of contractile proteins, basement membrane, laminin, type IV collagen and fibronectin in the normal human breast and its disorders. *J. Submicrosc. Cytol.*, **16**, 163-165 (1984).
- 60) **Charpin, C., Lissitzky, J. C., Jacquemier, J., Lavaut, M. N., Kopp, F., Pourreau-Schneider, N., Martin, P. M. & Toga, M.** : Immunohistochemical detection of laminin in 98 human breast carcinomas: A light and electron microscopic study. *Hum. Pathol.*, **17**, 355-365 (1986).
- 61) **Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M. & Shafie, S.** : Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, **284**, 67-68 (1980).
- 62) **Liotta, L. A., Rao, C. N. & Barsky, S. H.** : Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.*, **49**, 636-649 (1983).
- 63) **Liotta, L. A.** : Tumor invasion and metastases: Role of the basement membrane. *Am. J. Pathol.*, **117**, 339-348 (1984).
- 64) **Liotta, L. A. & Rao, C. N.** : Role of the extracellular matrix in cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **460**, 333-344 (1985).
- 65) **Ooshima, A.** : Collagen α B chain: Increased proportion in human atherosclerosis. *Science*, **213**, 666-668 (1981).
- 66) **Morton, L. F. & Barnes, M. J.** : Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. Investigation of collagens types I, III

and V. *Atherosclerosis*, **42**, 41-51 (1982).

- 67) **Ehrlich, H. P. & White, B. S.** : The identification of α A and α B collagen chains in hypertrophic scar. *Exp. Mol. Pathol.*, **34**, 1-8 (1981).
- 68) **Hayakawa, T., Hashimoto, Y., Myokei, Y., Aoyama, H. & Izawa, Y.** : The effect of skin grafts on the ratio of collagen types in human post-burn wound tissues. *Connect. Tissue Res.*, **9**, 249-252 (1982).
- 69) 橋本洋子, 来住準一, 早川太郎, 青山 久: 熱傷肉芽組織のV型コラーゲン. *結合組織*, **15**, 124-125 (1984).
- 70) **Madri, J. A. & Furthmayr, H.** : Collagen polymorphism in the lung. An immunocytochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum. Pathol.*, **11**, 353-366 (1980).
- 71) **Adachi, E. & Hayashi, T.** : *In vitro* formation of fine fibrils with a D-periodic banding pattern from type V collagen. *Collagen Rel. Res.*, **5**, 225-232 (1985).
- 72) **Adachi, E. & Hayashi, T.** : *In vitro* formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect. Tissue Res.*, **14**, 257-266 (1986).
- 73) **Dvorak, H. F., Quay, S. C., Orenstein, N. S., Dvorak, A. M., Hahn, P., Bitzer, A. M. & Carvalho, A. C.** : Tumor shedding and coagulation. *Science*, **212**, 923-924 (1981).
- 74) **Dvorak, H. F., Dickersin, G. R., Dvorak, A. M., Manseau, E. J. & Pyne, K.** : Human breast carcinoma: Fibrin deposits and desmoplasia. Inflammatory cell type and distribution. Microvasculature and infarction. *J. Natl. Cancer Inst.*, **67**, 335-345 (1981).
- 75) **Seemayer, T. A., Lagacé, R., Schürch, W. & Tremblay, G.** : Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma. A possible host response to neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.*, **3**, 525-533 (1979).
- 76) **Nakanishi, I., Kajikawa, K., Okada, Y. & Eguchi, K.** : Myofibroblasts in fibrous tumors and fibrosis in various organs. *Acta Pathol. Jpn.*, **31**, 423-437 (1981).

Distribution of Collagen Types (I , III, IV and V) and Laminin in the Stroma of Breast Carcinomas Toshinari Minamoto, Department of Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **95**, 975—990 (1986)

Key words : breast, scirrhous carcinoma, collagen, laminin, immunofluorescence.

Abstract

In order to investigate the possible mechanism of the formation of the fibrous stroma of scirrhous carcinoma, the distribution of collagen types I , III, IV and V , and laminin in breast carcinomas was studied, being compared with that in unaffected breast tissue and benign breast lesions including mastopathy and fibroadenoma, by an immunofluorescent technique using type-specific anti-collagen antibodies and monoclonal anti-laminin antibody. In unaffected breast tissue, type I and III collagens were diffusely distributed in the interlobular stroma, and type IV collagen and laminin were exclusively localized in the basement membrane region. Type V collagen was faintly identified in the intralobular loose connective tissue. The distribution pattern of the collagen types and laminin in benign breast lesions was almost the same as that in unaffected breast tissue. In carcinomas of the breast, both scirrhous and non-scirrhous, type I and III collagens were major components in the fibrous stroma where type V collagen was also recognized. It was noted that the fluorescence of type V collagen in scirrhous carcinoma was more intense than that in non-scirrhous carcinoma. Type IV collagen and laminin delineated the basement membranes of carcinoma cell nests continuously or partially discontinuously. In addition, in the stroma of scirrhous carcinoma, type IV collagen and laminin were present linearly along the margin of thick bundles of collagenous fibers. Carcinoma cells were not reactive with anti-collagen antibodies nor anti-laminin antibody. These findings suggested that type V collagen, as well as type I and III collagens, was involved in the formation of the stroma of scirrhous carcinoma as a result of stromal reaction.