Clear Cell Sarcoma (Malignant Melanoma of Soft Parts) 由来細胞株の樹立とその性状

新潟大学医学部皮膚科学教室（主任：伊藤雅章教授）
竹之内　辰　也

Establishment and Characterization of Clear Cell Sarcoma (Malignant Melanoma of Soft Parts) Cell Line

Tatsuya TAKENOUCHI

Department of Dermatology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Masaaki ITO)

A clear cell sarcoma (CCS) cell line, designated as NCS-1, was established in monolayer culture from xenograft line originating from metastatic CCS. Marked karyotypic aberrations and tumorigenicity in nude mice revealed the malignant derivation of the NCS-1 cell line. The cells contained abundant glycogen and were amelanotic by light microscopy. By electron microscopy, however, melanosomes in various developmental stages were seen. Electron microscopic Dopa reaction revealed the presence of tyrosinase activity. By enzyme-linked immunoadsorbent assay, the NCS-1 cells expressed 75-kd glycoprotein which has been identified as a marker of highly differentiated melanoma cells. From these data, the NCS-1 cells were found to retain both cytochemical and morphological properties of CCS. In applying the NCS-1 cells to the panel of melanocytic differentiation, it approximately corresponded to highly differentiated melanoma cells. In conclusion, the present study strongly supported the close cytogenic relationship between CCS and malignant melanoma.

Key words: Clear cell sarcoma cell line, Melanosome, Tyrosinase, Melanoma associated antigens, Melanocytic differentiation
明細胞肉腫由来細胞株，メラノソーム，チロジナーゼ，メラノーマ関連抗原，高分化型メラノーマ

緒　　言

clear cell sarcoma (CCS) は，1965年に Enzinger[1] により初めて報告された比較的稀な軟部組織肉腫である．当初，その組織起源については滑膜由来が考えられていた[2)3)]が，その後，腫瘍細胞にメラニン産生を認めたと

Reprint requests to: Tatsuya TAKENOUCHI, Department of Dermatology, Niigata University School of Medicine, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町 新潟大学医学部皮膚科学教室 竹之内辰也

する報告[4)5)]や，神経特異性蛋白である S-100 蛋白が陽性という報告[6)-8)]と合わせて，本腫瘍は neural crest 由来で，さらに悪性黒色腫（以下「メラノーマ」）の軟部組織の variant であるとする考え方が有力になってきた．Chung and Enzinger[6)]は141例の CCS を再評価し，“malignant melanoma of soft parts”という呼称を提唱した．一方，電顕的検索より，本腫瘍の起源をシュワン細胞に求めた報告も散見される[9)10)]．近年，抗メラノーマモノクローナル抗体である HMB-45 が CCS に陽性であり，他の軟部組織肉腫との鑑別においても有用なマーカーとなることが示された[11)12)]．

さて，ヒト腫瘍由来の培養細胞を用いた実験は癌研究においては不可欠なものであり，メラノーマにおいても多くの細胞株が樹立され，それらを用いて腫瘍の特性，起源などを検索する試みがなされている[13)-16)]．しかし，腫瘍細胞は株化して長期継代可能になる率は比較的低く，特に CCS のように比較的稀な腫瘍では，培養細胞を用いた研究の報告は数が少ない[17)18)]．今回，CCS の培養細胞株を樹立し，その in vitro での特性を検索することによりメラノーマとの比較検討を行ったのでここに報告する．

材料および方法

1．症　　例

38歳，男性．症例の詳細については既に報告済みである[19)]ので，ここでは概要を記載する．3ケ月前より左足底に腫瘤を生じ，急速に増大した．初診時の腫瘤の大きさは 25×30 mm で，表面には白色調の壊死組織が付着していた．生検にて CCS と診断し，左足の遠位部の切断および左鼠径リンパ節郭清術が施行された．摘出されたリンパ節の組織診では腫瘍の転移が認められた．術後の化学療法として1クールの CYVADIC 療法（cyclophosphamide，vincristine，doxorubicin，dacarbazine）と6クールの DAV 療法（dacarbazine，nimustine hydrochloride，vincristine）を施行した．術後1年8ケ月目に左膝窩リンパ節に転移を認めたため摘出術を受け，更に2クールの化学療法（cisplatin，vindesine，dacarbazine）およびインターフェロンβの局注を行った．その後，全身状態が悪化し，術後2年4ケ月で死亡．剖検にて肺，肝，心，腎，副腎の各臓器に遠隔転移を認めた．

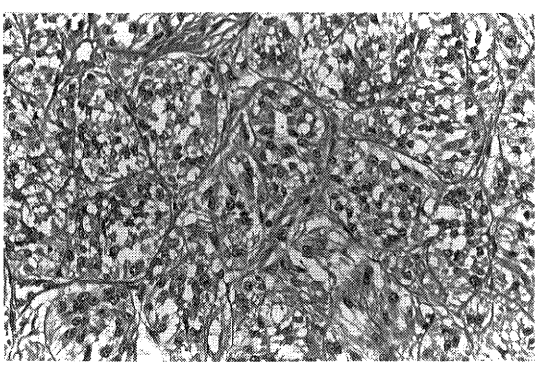


図 1　左足底の原発腫瘍の光顕組織像．澄明～好酸性の胞体を有した腫瘍細胞が小胞巣を形成．ヘマトキシリン・エオジン染色．

原発腫瘤の光顕組織像では，真皮内に線維性隔壁によって囲まれた多数の腫瘍細胞巣を認めた（**図 1**）．個々の腫瘍細胞は澄明から好酸性の細胞質を有し，核分裂像はわずかに認めるのみであった．ドーパ反応陰性で，細胞質内にアミラーゼ消化性の periodic acid Schiff（PAS）反応陽性顆粒を認めた．免疫組織化学的検索では，大部分の腫瘍細胞が S-100 蛋白を発現し，抗メラノーマ抗体である HMB-45 に陽性を示した．電顕的には細胞質内に豊富なグリコーゲン顆粒を有し，少数の類円形から楕円形のメラノソームを認めた[19)]．転移した左膝窩リンパ節の組織所見も原発腫瘍と同様であった．

2．培養材料および方法

転移リンパ節より無菌的に得られた手術材料をリン酸緩衝食塩水（PBS）で数回洗い，メスで粥状になるまで細切した．その材料を注射針を用いて4週齢の BALB/c ヌードマウスの背部皮下に接種した．接種後2～3週頃より皮下腫瘤の形成がみられ，それらが直径約 2 cm になった時点で摘出し，初回移植と同様の手順でヌードマウスへの接種を繰り返した．3代目の担癌マウスから摘出した腫瘍を細切後，0.25％トリプシン溶液で攪拌しながら15分消化し，遠沈後収集した細胞成分を増殖培地に再浮遊し，炭酸ガス培養器内で静置培養した．増殖培地には10％ fetal bovine serum 加 Dulbecco's modified Eagle's medium（Flow Lab.，USA）を用いた．

3．培養細胞の光顕および電顕的検索

継代20～30代目の培養細胞をスライドグラス上に培養し，PBS で洗浄した後，PAS 染色，メラニン染色，ドーパ反応を行い，光顕的に観察した．電顕標本の作製には，細胞浮遊液を遠沈しペレットを作製，グルタールアルデヒドとオスミウムの二重固定後，脱水しエポン包埋した．超薄切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し，JEM100 型透過型電子顕微鏡で観察した．電顕ドーパ反応[20)21)]には，グルタールアルデヒドによる短時間

表 1 NCS-1 細胞およびメラノーマ細胞における melanoma associated antigens の活性

Anti-bodies	Recognized antigens	Sources	O.D. 492 nm (X 1,000)				
			NCS-1	A375	G361	WM266-4	WM115
HMB-45	unknown	Enzo Biochem (New York, NY)	985	163	709	201	127
ME20-4	NGF-R	Amersham (High Wycombe, UK)	344	283	147	349	402
528	EGF-R	Oncogene Science (Mineola, NK)	——	185	——	——	148
B9.12.1	HLA class I	Becton-Dickinson (Mountain View, CA)	104	173	127	184	228
L243	HLA-DR	Becton-Dickinson	173	1,983	——	879	2,345
84H10	ICAM-1	Immunotech (Marseille, France)	325	1,038	109	1,840	1,161
T199	NCAM	Immunotech	——	——	138	——	193
R24	GD3	Signet Laboratories (Dedham, MA)	——	——	283	——	——
TA99	gp75	Signet Laboratories	1,530	——	209	——	——
L101	gp130	Signet Laboratories	721	820	682	833	476
PoAb	S-100 p	Dakopatts (Copenhagen, Denmark)	449	——	249	430	500

NGF-R: Nerve growth factor receptor, EGF-R: Epidermal growth factor receptor
ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1, NCAM: Neural cell adhesion molecule
——: less than 100

の固定後，2％ドーパ溶液に16時間浸漬し，再びグルタールアルデヒドにより前固定し，あとは同様の手順で標本を作製した．

4. 染色体分析

培養細胞の染色体分析はシオノギバイオメディカルラボラトリー（大阪）に依頼した．すなわち，コルヒチン添加により分裂中期細胞を集積し，トリプシンで遊離させた細胞を低張処理後，染色体を同定し，画像解析装置により核型を分析した．

5. enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA)[22)23)]

本細胞株における melanoma associated antigens（MAA）の発現を ELISA により検索した．使用した1次抗体を**表 1** に示す．対照として，A375，G361，WM266-4，WM115 の4種のメラノーマ細胞株（大日本製薬，大阪）を使用した．それぞれの細胞を96穴マイクロウェルプレートに 2×10^4／ウェルになるよう分注し，24時間培養後，4％パラホルムアルデヒドで1時間固定した．細胞質内に存在する抗原（HMB-45 の認識抗原，gp75，S-100 蛋白）を検出するため0.1％ Triton X-100 で10分間の膜透過処理を行った．2％牛血清アルブミン加 PBS で1時間ブロッキングした後，1次抗体で1時間，さらにペルオキシダーゼ標識2次抗体で1時間インキュベートし，パラフェニレンジアミンを基質として発色させ，ELISA スキャナー（EAR 340 AT, SLT-Labinstruments, Austria）を用いて 492 nm における吸光度を測定した．triplicate の平均値を算定した．

6. ヌードマウスへの異種移植

5×10^6／0.1 ml の培養細胞を4週齢の BALB/c ヌードマウスの背部皮下に接種した．6～8週後に生着した腫瘤を摘出し，パラフィン包埋し，光顕的に観察した．

結　　果

1. NCS-1 株の樹立

in vitro の培養系に入って3回目の継代の頃から線維芽細胞の混入がみられたが，腫瘍細胞の増殖が旺盛であり，継代を繰り返すうちに線維芽細胞は消失した．50代を越えても安定した増殖をみせ，株化したとみなし，NCS-1 と命名した．位相差顕微鏡による観察では，NCS-1

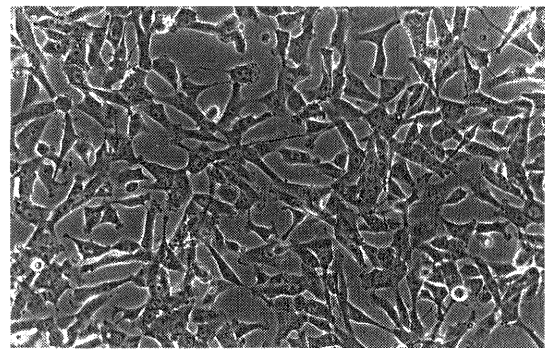


図 2 NCS-1 細胞の位相差顕微鏡像．紡錘～多角形の細胞が付着性に増殖．

は主に紡錘形の形態を有し，培養器内では付着性に増殖した（図 2）．細胞が confluent になっても contact inhibition はみられず，pile up して増殖する様子が観察された．

2. NCS-1 の光顕および電顕所見

PAS 染色ではほとんどの細胞の細胞質に一致して陽性顆粒が認められた（図 3）．それらはアミラーゼ処理によって消失するため，グリコーゲンと考えられた．メラニン染色および光顕ドーパ反応はともに陰性であった．

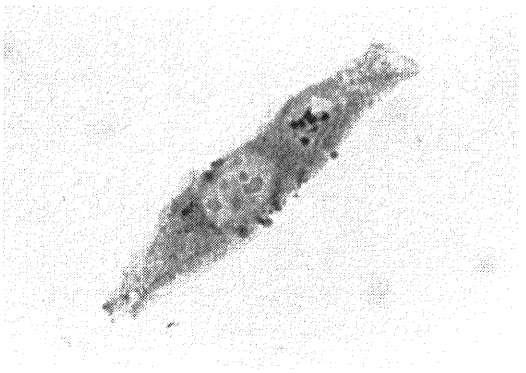


図 3　NCS-1 細胞の PAS 染色所見．細胞質に陽性顆粒を認める．

電顕による観察では，腫瘍細胞は豊富な細胞質と不規則な形の大型の核を持ち，円形から卵円形のミトコンドリアが多数認められた．大多数の細胞の細胞質にグリコーゲン顆粒がみられた．円形から卵円形，さらに長楕円形まで種々の形態を示すメラノソームが散在し，内部に層板状構造を有していた．メラニン沈着は不均一，きわめて少量であった（図 4）．電顕ドーパ反応では，ゴルジ装置および小胞に陽性所見を認め，メラノソーム内の電子密度も増加し，チロジナーゼ活性が示された（図 5）．

3. 染色体分析

20の分裂中期細胞を分析した．染色体数のモードは70で，その中には同定不能であったマーカー染色体を1つ含んでいた．4，10，14，22の染色体を除いた残りの染色体は全て，数あるいは構造的な異常を認めた（図 6）．

4. NCS-1 における MAA の発現

ELISA の結果を表 1 に示す．492 nm における O.D. 値を 1,000 倍にした数値で，他の4種のメラノーマ細胞株と比較した．NCS-1 は，検索を行った11種のうちの8種の MAA を発現していた．抗メラノーマモノクローナル抗体である HMB-45 は，NCS-1 を含めた全ての細胞株に反応性を示し，特に NCS-1 においては高値を示した．ヒトのメラノサイト系細胞に最も強く発現する糖蛋白とされている gp75 は，NCS-1 と G361 において

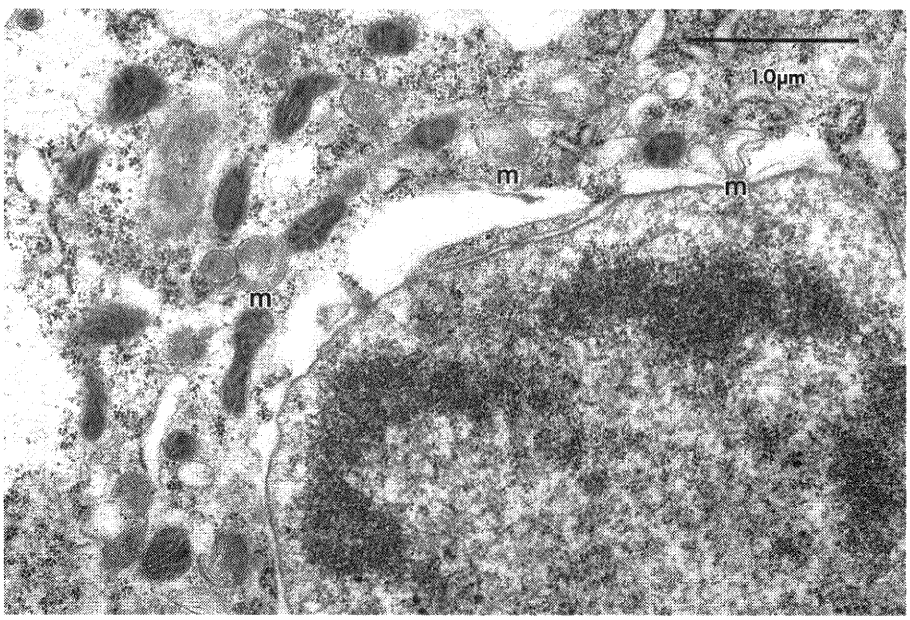


図 4　NCS-1 細胞の電顕像．内部に層状構造を有するメラノソーム（m）を認める．

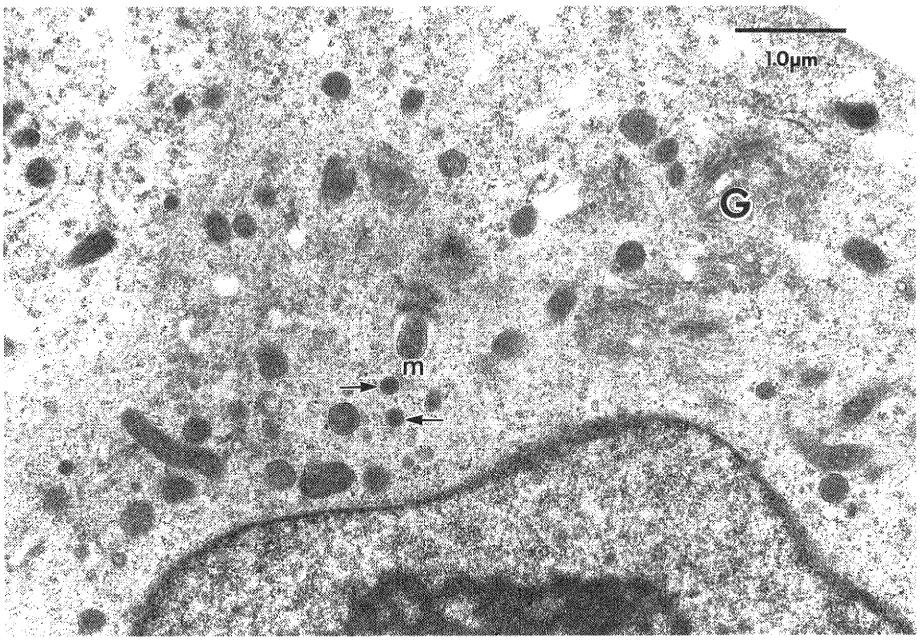


図 5　NCS-1 細胞の電顕ドーパ反応所見．ゴルジ装置（G）および小胞（矢印）に陽性反応が認められる．m：メラノソーム．

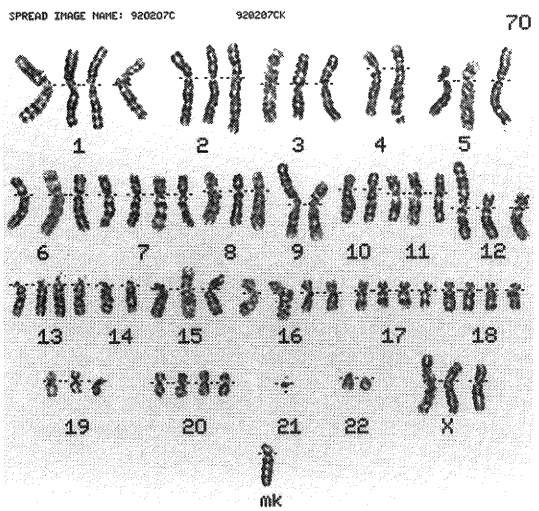


図 6　NCS-1 細胞の核型．70，XXX，−21，+1，+1p−，+2，+3，+5p+，+6，+7，+7，+8，+11，+der (12)，t (1；12) (q21；p13)，+13，+13，+15p+，+16q+，+16q+，+17，+17，+18，+18，+19，+20，+20，+mar，9p+，15p+，i (21p)

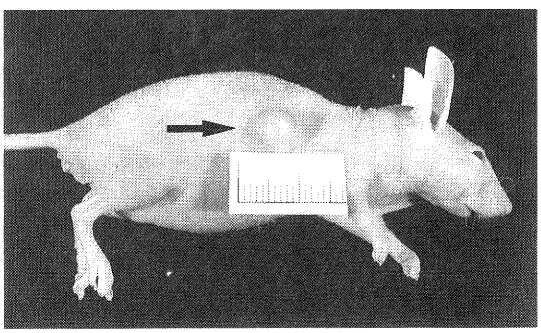


図 7　NCS-1 細胞を背部皮下に移植された BALB/c ヌードマウス．接種後21日目の生着腫瘍（矢印）．

のみ発現されたが，とくに NCS-1 で強い活性を示した．

5．NCS-1 のヌードマウスにおける異種移植

皮下に接種を受けた10匹の BALB/c ヌードマウスのすべてに腫瘍の生着を認めた（図 7）．腫瘍摘出時の解剖所見では，肉眼的には肺，肝，リンパ節などへの転移は認めなかった．移植腫瘍の光顕組織所見を図 8 に示す．原発の腫瘍に比し，均一な卵円形の核が多く，小型の胞巣が目立つが，核分裂像に乏しく，ほぼ同様な組織像であった．

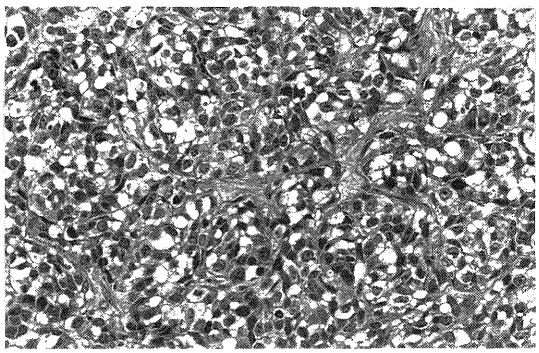


図 8　ヌードマウスに移植された NCS-1 細胞の光顕像．原発腫瘍と類似の組織像を呈する．ヘマトキシリン・エオジン染色．

考　　按

これまで，過去に CCS の細胞株を樹立したとする報告は2つだけである．最初の報告は，Epstein ら[17]による SU-CCS-1 株であり，その細胞は付着性に増殖するが，細胞質が円形である点が NCS-1 とは異なる．また，彼らは radioimmunoassay により MAA の発現を検索し，メラノーマとの類似性を論じた．2番目の報告[18]は，HS-MM と命名された CCS の細胞株で，NCS-1 と同様に，HMB-45 が陽性であった．しかしながら，これら2種の細胞株では，電顕的検索によってもメラノソームの存在が確認できておらず，NCS-1 は，メラノソームの産生能を保持している CCS の細胞株としては初めてのものと言える．Mii ら[24]は，CCS の2症例につき原発腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の電顕ドーパ反応を施行し，チロジナーゼ活性の存在を証明した．NCS-1 も光顕的には amelanotic であったが，電顕ドーパ反応で陽性を示した．このことは，メラノーマを含めた色素細胞に特異的な機能であるメラニン産生能を，NCS-1 が潜在的に有している事を示す．また，NCS-1 は，アミラーゼ消化性の PAS 陽性顆粒を認め，電顕的にもグリコーゲンが存在することから，原腫瘍の生化学的な性質を良く保持していることが分かる．CCS におけるグリコーゲンの存在は，滑膜肉腫など他の軟部組織肉腫との鑑別の上で重要な所見であるとされている[6]．

NCS-1 における MAA の発現をメラノーマ細胞株と比較するため，ELISA による定量を行った．nerve growth factor receptor および S-100 蛋白の発現は，NCS-1 細胞が neural crest に起源を有する事を示す．モノクローナル抗体 TA99 によって認識される抗原である gp75 は，メラノソームに存在する糖蛋白であり，ヒトのメラノサイトおよびメラニン産生を伴ったメラノーマ細胞に優位に発現することから，pigmentation-associated antigen とも呼ばれている[25]．Thomson らは，メラニン産生性のメラノーマに対して TA99 による免疫電顕を施行し，gp75 が stage Ⅲ，Ⅳメラノソームに限局して存在することを示した[26]．一方，モノクローナル抗体 HMB-45 は，従来よりメラノーマおよびその関連病変に対する特異的マーカーとして広く利用されている[27][28]．その認識抗原は未だ同定されていないが，メラノソームの構造蛋白の一部であろうと推察され，Schaumburg-Lever ら[29]は，メラノーマにおける免疫電顕的検索から，HMB-45 の反応部位が stage Ⅰ，Ⅱおよびメラニン沈着のみられない stage Ⅲメラノソームに存在すると報告した．今回検索を行った11種の MAA のうち，TA99 と HMB-45 は，NCS-1 と G361 の両細胞株においてのみ高い反応強度を示した．このことは，これら2種の細胞株がメラニン形成に関して近い性質を有することを示唆する．また，NCS-1 が TA99 に対して極めて強く反応したことは，本細胞株がメラニン産生能を有する事を示す．

Houghton ら[30-32]は多数のメラノーマ細胞株を用いた解析から，MAA の発現はメラノーマの分化に伴い段階的に変動し，細胞の形態，チロジナーゼ活性，メラニン産生などと並んで，メラノーマ細胞の分化度を示すマーカーとなり得る事を示した．彼らはメラノーマの分化度を，正常メラノサイトの発生段階に対応して，early，intermediate，late の3つの型に分類した．それによると early stage 型，すなわち低分化型のメラノーマ細胞は，類上皮形で，メラニン産生がみられず，epidermal growth factor receptor や HLA-DR に代表される early antigens を発現する．これに対して late stage 型，すなわち高分化型のメラノーマは，樹枝状に近い形態で，メラニン生成能を有し，gp75 のような late antigens を発現する．今回の検索において，NCS-1 細胞は gp75 を強く発現し，epidermal growth factor receptor，HLA-DR についてはほとんど発現しなかった．また，電顕ドーパ反応によってメラニン生成能を有していることも確認された．これらの所見から，NCS-1 は細胞生物学的には高分化型のメラノーマ細胞に相当するものと考えられる．

結　　論

CCS 患者の転移リンパ節より，ヌードマウスを経由して，in vitro の細胞株 NCS-1 を樹立した．NCS-1 は，

生化学的および形態学的に原腫瘍としての CCS の性質すなわち，グリコーゲン保有，メラノソームの形成能などを良く保持していた．また，NCS-1 は抗原活性の面から，メラノーマ細胞株との類似性が高く，その分化の lineage に当てはめると，高分化型のメラノーマに相当した．これらの所見から，CCS は in vitro においてもメラノーマにきわめて類似し，malignant melanoma of soft parts という名称は妥当であると思われる．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました新潟大学医学部皮膚科伊藤雅章教授に深謝いたします．また，直接御指導，御教示をいただいた伊藤薫講師，風間隆講師，ならびに標本作製に御助力をいただいた今井隆郎技官に心より謝意を表します．

参 考 文 献

1) **Enzinger, F.M.**: Clear-cell sarcoma of tendons and aponeuroses., Cancer, **18**: 1163～1174, 1965.
2) **Kubo, T.**: Clear-cell sarcoma of patellar tendon studied by electron microscopy., Cancer, **24**: 948～953, 1969.
3) **Hajdu, S.I., Shiu, M.H. and Fortner, J.G.**: Tendosynovial sarcoma. A clinicopathological study of 136 cases., Cancer, **39**: 1201～1217, 1977.
4) **Bearman, R.M., Noe, J. and Kempson, R.L.**: Clear cell sarcoma with melanin pigment., Cancer, **36**: 977～984, 1975.
5) **Boudreaux, D. and Waisman, J.**: Clear cell sarcoma with melanogenesis., Cancer, **41**: 1387～1394, 1978.
6) **Chung, E.B. and Enzinger, F.M.**: Malignant melanoma of soft parts: A reassessment of clear cell sarcoma., Am. J. Surg. Pathol., **7**: 405～413, 1983.
7) **Mukai, M., Torikata, C., Iri, H., Mikata, A., Kawai, T., Hanaoka, H., Yakumaru, K. and Kageyama, K.**: Histogenesis of clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses. An electron-microscopic, biochemical, enzyme histochemical, and immunohistochemical study., Am. J. Pathol., **114**: 264～272, 1984.
8) **Benson, J.D., Kraemer, B.B. and Mackay, B.**: Malignant melanoma of soft parts: An ultrastructural study of four cases., Ultrastruct. Pathol., **8**: 57～70, 1985.
9) **Azumi, N. and Turner, R.R.**: Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: Electron microscopic findings suggesting schwann cell differentiation., Hum. Pathol., **14**: 1084～1089, 1983.
10) **Ohno, T., Park, P., Utsunomiya, Y., Hirahata, H. and Inoue, K.**: Ultrastructural study of a clear cell sarcoma suggesting Schwannian differentiation., Ultrastruct. Pathol., **10**: 39～48, 1986.
11) **Swanson, P.E. and Wick, M.R.**: Clear cell sarcoma: An immunohistochemical analysis of six cases and comparison with other epithelioid neoplasms of soft tissue., Arch. Pathol. Lab. Med., **113**: 55～60, 1989.
12) **Hasegawa, T., Hirose, T., Kudo, E. and Hizawa, K.**: Clear cell sarcoma: An immunohistochemical and ultrastructural study., Acta Pathol. Jpn., **39**: 321～327, 1989.
13) **Herlyn, M., Thurin, L., Balaban, G., Bennicelli, J.L., Herlyn, D., Elder, D.E., Bondi, E., Guerry, D., Nowell, P., Clark, W.H. and Koprowski, H.**: Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression., Cancer Res., **45**: 5670～5676, 1985.
14) **Hoal, E.G., Wilson, E.L. and Dowdle, E.B.**: Characterization of seven human melanoma cell lines: Melanogenesis and secretion of plasminogen activators., Br. J. Cancer, **54**: 287～295, 1986.
15) **Rofstad, E.K., Wahl, A., Hystad, M.E., Nesland, J.M. and Stokke, T.**: Establishment in monolayer culture and characterization of four human melanoma cell lines., Virchows Arch. [B], **60**: 189～197, 1991.
16) **Avinoach, I. and Aflalo, E.**: Human melanoma cell lines established from metastases of a patient with a completely regressed primary site., Cancer, **69**: 113～122, 1992.
17) **Epstein, A.L., Martin, A.O. and Kempson, R.**: Use of a newly established human cell line (SU-CCS-1) to demonstrate the relationship of clear cell sarcoma to malignant melanoma., Cancer Res., **44**: 1265～1274, 1984.

18) **Sonobe, H., Manabe, Y., Furihata, M., Iwata, J., Hikita, T., Tanimoto, T., Kiuna, O., Oka, T., Ohtsuki, Y., Mizobuchi, H., Kawashita, S. and Kumano, O.**: Establishment and characterization of a human cell line, HS-MM, derived from a case of clear cell sarcoma., Human Cell, **3**: 352～356, 1990.

19) **Shimizu, N., Ito, M., Takenouchi, T., Fujiwara, H., Ito, K. and Sato, Y.**: An immunohistochemical and ultrastructural study of clear cell sarcoma in comparison with amelanotic malignant mela-noma., J. Clin. Electron Microscopy, **23**: 1024～1025, 1990.

20) **Ito, M., Hashimoto, K. and Organisciak, D.T.**: Ultrastructural, histochemical, and biochemical studies of the melanin metabolism in eye and skin of pallid mice., J. Invest. Dermatol., **78**: 414～424, 1982.

21) **Ito, M., Hashimoto, K. and Organisciak, D.T.**: Ultrastructural, histochemical and biochemical studies of the melanin metabolism in pallid mouse eye., Curr. Eye Res., **2**: 13～28, 1983.

22) **Doherty, P., Dickson, J.G, Flanigan, T.P. and Walsh, F.S.**: Quantitative evaluation of neurite outgrowth in cultures of human foetal brain and dorsal root ganglion cells using an enzyme-linked immunoadsorbent assay for human neurofilament protein., J. Neurochem., **42**: 1116～1122, 1984.

23) **Doherty, P., Seaton, P., Flanigan, T.P. and Walsh, F.S.**: Factors controlling the expression of the NGF receptor in PC12 cells., Neurosci. Lett., **92**: 222～227, 1988.

24) **Mii, Y., Miyauchi, Y., Hohnoki, K., Maruyama, H., Tsutsumi, M., Dohmae, K., Tamai, S., Konishi, Y. and Yamanouchi, T.**: Neural crest origin of clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: Ultrastructural and enzyme cytochemical study of human and nude mouse-transplanted tumours., Virchows Arch. [A], **415**: 51～60, 1989.

25) **Thomson, T.M., Mattes, M.J., Roux, L., Old, L.J. and Lloyd, K.O.**: Pigmentation-associated glycoprotein of human melanomas and melanocytes: Definition with a mouse monoclonal antibody., J. Invest. Dermatol., **85**: 169～174, 1985.

26) **Thomson, T.M., Real, F.X., Murakami, S., Cordon-Cardo, C., Old, L.J. and Houghton, A.N.**: Differentiation antigens of melanocytes and melanoma: Analysis of melanosome and cell surface markers of human pigmented cells with monoclonal antibodies., J. Invest. Dermatol., **90**: 459～466, 1988.

27) **Duray, P.H., Palazzo, J., Gown, A.M. and Ohuchi, N.**: Melanoma cell heterogeneity: A study of two monoclonal antibodies compared with S-100 protein in paraffin sections., Cancer, **61**: 2460～2468, 1988.

28) **Wick, M.R., Swanson, P.E., Rocamora, A.**: Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors., J. Cutan. Pathol., **15**: 201～207, 1988.

29) **Schaumburg-Lever, G., Metzler, G. and Kaiserling, E.**: Ultrastructural localization of HMB-45 binding sites., J. Cutan. Pathol., **18**: 432～435, 1991.

30) **Houghton, A.N., Eisinger, M., Albino, A.P., Cairncross, J.G. and Old, L.J.**: Surface antigens of melanocytes and melanomas: Markers of melanocyte differentiation and melanoma subsets., J. Exp. Med., **156**: 1755～1766, 1982.

31) **Houghton, A.N., Real, F.X., Davis, L.J., Cordon-Cardo, C. and Old, L.J.**: Phenotypic heterogeneity of melanoma: Relation to the differentiation program of melanoma cells., J. Exp. Med., **164**: 812～829, 1987.

32) **Albino, A.P. and Houghton, A.N.**: Cell surface antigens of melanocytes and melanoma., Cancer Surveys, **4**: 185～211, 1985.

（平成5年1月18日受付）