

ヒト口腔および子宮頸部粘膜における上皮性異形成の細胞増殖活性度分析による病理組織学的研究

小林, 家吉
九州大学歯学研究科歯学基礎系専攻

<https://doi.org/10.11501/3097513>

出版情報：九州大学, 1994, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

ヒト口腔および子宮頸部粘膜における上皮性異形成の
細胞増殖活性度分析による病理組織学的研究

小 林 家 吉

九州大学歯学部口腔病理学講座

(1994)

ヒト口腔および子宮頸部粘膜における上皮性異形成の細胞増殖活性度分析による病理組織学的研究

①

ヒト口腔および子宮頸部粘膜における
上皮性異形成の細胞増殖活性度分析による
病理組織学的研究

**The Proliferative Activity in Epithelial Dysplasia of Oral mucosa and
Uterine Cervix Analyzed by Proliferating Cell Nuclear Antigen
Immunostaining and Silver Binding Argyrophilic Nucleolar Organizer
Region Staining**

小林 家吉

九州大学歯学部口腔病理学講座
(指導：坂井英隆 教授)

Ieyoshi Kobayashi

Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry,
Kyushu University
(Director: Prof. Hidetaka Sakai)

—目次—

	頁
1. 要旨	1
2. 緒言	3
3. 材料および方法	6
4. 子宮粘膜上皮性異形成における細胞増殖活性度	10
4-1. PCNA免疫組織化学染色による検討	10
4-2. AgNOR染色による検討	13
4-3. 核分裂像による検討	15
4-4. 各指標間の関連性	16
4-5. 考察	17
5. 口腔粘膜上皮性異形成における細胞増殖活性度	19
5-1. PCNA免疫組織化学染色による検討	19
5-2. AgNOR染色による検討	22
5-3. 核分裂像による検討	24
5-4. 各指標間の関連性	25
5-5. 考察	26
6. 口腔粘膜上皮性異形成における異形成度と細胞増殖活性との関係	28
6-1. 細胞増殖活性と組織学的所見の関連性	28
6-2. 考察	30
7. 総括ならびに結論	32
8. 謝辞	33
9. 文献	34

1. 要旨

口腔および子宮頸部粘膜の上皮性異形成における異形成度と細胞増殖能との関連性をProliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)、silver binding argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR)、および核分裂像を指標として検索し、細胞増殖活性度と病理組織構成要素との相関を捉え、異形成度に相関した組織形態学的特徴について把握する事を本研究の目的とした。検査材料は、子宮頸部粘膜については上皮性異形成 (22例)、上皮内癌 (4例) および正常重層扁平上皮 (4例) の合計30例、口腔粘膜については異形成を伴わない白板症 (12例)、上皮性異形成 (24例) および扁平上皮癌 (24例) の合計60例である。子宮頸部粘膜の上皮性異形成では、PCNA陽性率 (PI) および核分裂像出現率 (MI) による異形成層と非異形成層を合わせた上皮全層の検索において、両指標ともに異形成度に関連し有意な増加を示した。一方異形成層に限定した場合のPIには有意差は認めなかった。しかしながら、MIは異形成度に相関した増加を認め、さらにPIとMIの両指標間には有意な相関性が認められたことより、異形成度に関連した増殖活性の増加があることがわかった。また上皮内癌におけるPIとMIは高度上皮性異形成と比較して明らかに高値を示した。AgNOR数 (AI) は各異形成群間にわずかな増加傾向がみられたものの、異形成度に相関した有意な差異は認めなかった。さらに高度上皮性異形成と上皮内癌の間にも有意差を認めなかった。一方、口腔粘膜における上皮性異形成のPIとMIは異形成を伴わない白板症より高く、扁平上皮癌より低かった。また各症例群間には有意差を認めた。AIについては上皮性異形成と異形成を伴わない白板症間には有意差はみられなかったものの、扁平上皮癌は上皮性異形成と比較して明らかに高い値を示した。さらにPIとMI間には明らかな相関性があり、この相関性より選出した高い増殖活性度を示す上皮性異形成症例では、「基底細胞の極性の喪失」、

「核細胞質比の増大」、「細胞の多形性」および「大きな核小体」などの組織形態学的構成要素が有意な所見であった。これより口腔粘膜上皮性異形成の異形成度の判定には PCNA 免疫染色と核分裂像を指標とした増殖活性度の検索が有用であり、この検索結果から導き出された組織学的構成要素は高度上皮性異形成に関連した所見と考えられた。

注) 本研究の一部は下記の論文に報告した。

The Proliferative Activity in Dysplasia and Carcinoma In Situ of the Uterine cervix Analyzed by Proliferating Cell Nuclear Antigen Immunostaining and Silver-Binding Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Staining

I.Kobayashi, K. Matsuo, Y. Ishibashi, S. Kanda and H. Sakai

Human Pathology Volume25, No.2 Page 198-202¹⁾

2. 緒言

口腔および子宮頸部粘膜における上皮性異形成は、臨床病理学的に前癌病変 (precancerous lesion) の範疇に位置付けられている。すなわち口腔粘膜においては、正常重層扁平上皮が上皮性異形成を経て扁平上皮癌に癌化すると捉えられている²⁾。一方、子宮頸部粘膜では口腔粘膜と同様の癌化と、円柱上皮下に存在する予備細胞 (reserve cell) が一旦扁平上皮化生 (squamous metaplasia) を起こし、上皮性異形成を経て扁平上皮癌に癌化する二通りの経過が捉えられている³⁾。このように、両病変の組織発生が異なる点を除けば、子宮頸部粘膜および口腔粘膜における癌化の経過には病理学的に多くの共通点が類推できる。

病理組織診断では子宮頸部粘膜における上皮性異形成の定義ならびに異形成度分類は世界保健機構、World Health Organization (WHO) により明確になされている⁴⁾⁵⁾。しかしながら口腔粘膜の上皮性異形成においては、上皮組織の形態が子宮頸部粘膜ほど単純ではなく、複雑な上皮脚の延長を認めることや、さらに異型細胞の存在様式が子宮頸部粘膜の病変のように規則的な層状を示すことなく、不規則に粘膜上皮内に分布していることなどから、日常の病理組織診断に際して異形成度の判定にはしばしば困難が伴うことがある。従来より口腔粘膜の異型上皮における異形成度の判定に関連してWHO Collaborating Centre (1978) により上皮性異形成と診断するために必要な病理組織学的所見の12項目が挙げられている。しかしながら異形成度についての明確な分類は成されていない⁶⁾⁷⁾。それゆえに口腔粘膜上皮性異形成の異形成度の診断は、病理医の経験に基づく主観的判断に委ねられているのが現状である。

悪性腫瘍の本質的な性質はその自律的かつ無制限な細胞増殖にあり、前癌病変においても細胞増殖が強く関わっている⁸⁾。従って子宮頸部粘膜ならびに口腔粘膜における上皮性異形成病変の病理学的特徴を検索す

る指標として「細胞増殖」を用いる事が最も有効な手段であると考えられる。今回、著者は細胞増殖の数種の指標にて子宮頸部粘膜上皮性異形成を検索し、異形成度分類における細胞増殖活性度の相関性を検討し、この結果より導き出された有効な指標を用いて口腔粘膜上皮性異形成の細胞増殖活性度を検索し、細胞増殖活性度と病理組織構成要素との相関を捉え、異形成度に相関した組織形態学的特徴について把握する事を目的とした。

従来、この細胞増殖活性度の具体的な指標として病理組織学の分野では核分裂像の出現率を指標として研究がなされてきた。Chiら⁹⁾は、子宮頸部粘膜の上皮性異形成および上皮内癌における核分裂像数を検索し、核分裂像の指標は簡便で有効な指標と評価している。近年になり主に腫瘍の悪性度診断の研究において免疫組織化学的染色法による Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 陽性率および silver binding argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) 法による黒点数が細胞増殖活性度の新たな指標として利用されている¹⁰⁾⁻¹⁴⁾。Tsujiら¹¹⁾は、口腔粘膜および皮膚における扁平上皮癌および前癌病変(白板症,老人性角化症,ボウエン病)を PCNA 免疫組織化学染色で検索し、PCNA 陽性率はこれらの病変における増殖細胞の検索に有用な指標であると評価している。

PCNA は、核内に存在する非ヒストン蛋白で、G 1 後期から S 期に増量し G 2 期と M 期には減量している¹⁵⁾。PCNA の主な役割は、DNA 合成の調整および DNA polymerase- δ の補助蛋白として細胞増殖に深く関与している¹⁶⁾。一方、AgNOR は、ribosomal RNA に転写される ribosomal DNA のループ状構造である NOR に非常に関係している¹⁷⁾。NOR の生物学的意義は、蛋白合成の為の核酸の転写において重要な場として果たす¹⁸⁾。悪性腫瘍の増殖活性度と分化度の検索において銀粒子が付着した黒点数の数および大きさは有効な指標として評価されてきた¹⁹⁾。しかし、最近の報告では AgNOR 染色は、NOR そのものだけでなく RNA polymerase

I のような核内蛋白をも表わしていることが判明している²⁰⁾²¹⁾。従って AgNOR 染色は、増殖、分化および蛋白合成など細胞の総合的代謝活性を評価していると考えられる²²⁾。

本研究において PCNA 免疫組織化学染色法による陽性率, AgNOR 染色による黒点数および核分裂像出現率の3通りの指標を使用し、細胞増殖活性度の観点より両病変を検索した。さらに、口腔粘膜上皮性異形成の異形成度に相関した組織形態学的特徴を捉えるため、増殖活性度に相関性のある有効な指標を基に増殖活性の高い症例を選出し、WHO Collaborating Centre⁷⁾ (Table 1) により定められた病理組織学的項目のうち、より異形成度の高い症例に関連した組織学的所見を決定した。

Table 1 Histologic Components of Epithelial Dysplasia

-
- (1) Loss of polarity of the basal cells
 - (2) The presence of more than one layer of cells having a basaloid appearance
 - (3) An increased nuclear-cytoplasmic ratio
 - (4) Drop-shaped rete processes
 - (5) Irregular epithelial stratification
 - (6) Increased number of mitotic figures (a few abnormal mitoses may be present)
 - (7) The presence of mitotic figures in the superficial half of the epithelium
 - (8) Cellular pleomorphism
 - (9) Nuclear hyperchromatism
 - (10) Enlarged nucleoli
 - (11) Reduction of cellular cohesion
 - (12) Keratinization of single cells or cell groups in the prickle layer
-

Source: WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous lesions (1978).

3. 材料および方法

検査材料

子宮頸部粘膜病変は、千早病院（福岡市）婦人科にて1991年の1年間に punch あるいは cone biopsy され、10%ホルマリン固定・パラフィン包埋された生体組織検査標本30例を使用した。組織標本は、WHO の分類³⁾⁴⁾に従って診断された上皮性異形成22例、上皮内癌4例および対照として正常重層扁平上皮4例よりなる。しかし、これらの発生母地は、組織切片が小さため固有の扁平上皮細胞由来か、円柱上皮下の予備細胞が扁平上皮化生した上皮由来か判別できず、組織発生の母地による分類は行わず、一括して検索を行った。各症例の臨床的事項を Table 2 に示す。

口腔粘膜病変は、九州大学第一口腔外科にて1988年から1993年までの6年間に incisional あるいは excisional biopsy され、10%ホルマリン固定・パラフィン包埋された生体組織検査標本60例を使用した。組織標本は、WHO分類⁵⁾⁶⁾に従って診断し、異形成を伴わない白板症の12例、上皮性異形成の24例および扁平上皮癌の24例よりなる。また、各症例の臨床的事項は Table 2 に示す。

両病変の標本から 5 μ m の厚さに連続切片を作成し、脱パラフィン処理後、PCNA 免疫組織化学染色および AgNOR 染色を施し観察に供した。

Table 2 Clinical profiles of uterine cervical and oral diseases

	Uterine cervical diseases*					Oral diseases**		
	SE (n=4)	MiD (n=6)	MoD (n=9)	SD (n=7)	CIS (n=4)	LP (n=12)	ED (n=24)	SCC (n=24)
Sex (male/female)	0/4	0/6	0/9	0/7	0/4	5/7	18/6	14/10
Age (range of age)(yr) (mean \pm SD)	34~48 (40.5 \pm 6.6)	29~48 (38.0 \pm 6.3)	28~45 (37.1 \pm 5.6)	36~52 (43.1 \pm 5.1)	35~39 (37.0 \pm 1.8)	23~81 (58.2 \pm 18)	47~71 (59.1 \pm 7.6)	43~76 (61.0 \pm 9.8)
Sites uterine cervix	4	6	9	7	4			
tongue						8	16	10
buccal mucosa						1	3	2
gingiva						2	1	5
lip						1		5
oral floor							4	
palate								2

Uterine cervical diseases*: (SE=normal stratified squamous epithelium; MiD,=mild dysplasia; MoD=moderate dysplasia; SD=severe dysplasia; CIS=carcinoma *in situ*); Oral diseases**: (LP=leukoplakia without any dysplastic changes; ED=epithelial dysplasia; SCC=squamous cell carcinoma)

PCNA免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は、一次抗体としてマウス抗 PCNA 抗体 (PC-10, DAKO, Denmark) を使用し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン-ビオチン複合体法にて施行した。薄切された組織切片はキシレンで脱パラフィンした後、免疫組織化学的染色の反応性を高めるために10mMクエン酸溶液にて加熱処理 (90°C, 60min) を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害のため 0.5 % 過ヨウ素酸、および抗体の非特異的反応を抑制するため10 % 家兔正常血清で各々 10分および 20分間前処理したのち、一次抗体 (1:50に希釈) と 1時間反応させた。さらに切片をマウス抗体

用HISTOFINE immunostaining kit (Nichirei, Japan) にてビオチン標識ラビット抗マウス抗体を10分間、続いてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを5分間反応させた。その後、0.02 % 3,3' DAB-H₂O₂溶液により5分間発色させ、1 %メチルグリーンによる対比核染色をした。すべての酵素抗体反応は室温で施行し、各反応後の洗浄は0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.2)を使用した。一次抗体のマウス抗 PCNA 抗体 (PC-10, DAKO, Denmark) の特異性については、すでに報告され確かめられている¹¹⁾²³⁾。この一次抗体の加熱処理による増強について予備実験を行い、非加熱処理の染色より核内陽性像が増強され、かつ非特異反応の抑制を認めたが、陽性細胞数には明らかな差がない事を確認した。

AgNOR染色

Plotonら²⁴⁾²⁵⁾によって報告された方法に基づいて染色を行った。すなわちミリポアフィルターを通した蒸留水に蟻酸 1 g/dl とゼラチン 2 g/dl を溶解させて溶液Aとする。同様の蒸留水に50%の硝酸銀を溶解させて溶液Bとする。キシレンで脱パラフィン処理された組織切片を風乾後、溶液Aと溶液Bとを 1 : 2 の割合で暗室中にて混合し、直ちにこの混合液中において組織切片を 25 分間反応 (室温) させた。反応後蒸留水でよく洗浄し、1 %メチルグリーンによる対比核染色をした。

PCNA免疫組織化学染色, AgNOR染色および核分裂像の評価

PCNA免疫組織化学染色による陽性率 (PI) は、同一組織切片中少なくとも300個の上皮細胞においてコンピューター画像解析装置 (NEXUS QUBE, NEXUS社) によって計測した。細胞1個当たりの AgNOR 数 (AI) は、同一組織切片中100個の上皮細胞の核内における平均黒点数を光学顕微鏡 (X400) 下にて計測した。核分裂像の出現率 (MI) は、同一組織切

片中少なくとも300個の上皮細胞において光学顕微鏡 (X200) 下にて計測した。これらの統計学的有意差検定は t-検定を、各指数の相関性検定は Pearson の相関係数を用いた。さらに口腔粘膜上皮性異形成における組織形態学的特徴の評価は、Fisher の直接確率計算法にて行った。

4. 子宮頸部粘膜上皮性異形成における細胞増殖活性度¹⁾

4-1. PCNA免疫組織化学染色による検討

PCNA陽性所見は、核内に顆粒状を呈し、全ての症例に認められた。PCNA陽性細胞の分布は、対照例では、重層扁平上皮層の主に基底細胞層に認められ (Fig.1A)、上皮性異形成例では、異形成層に一致して拡がっており (Fig.1B,C)、上皮内癌では全層にわたって認められた。異形成層と非異形成層を含めた上皮全層より得られたPIは、扁平上皮化生を含めた重層扁平上皮 (SE),軽度上皮性異形成 (MiD),中等度上皮性異形成 (MoD),高度上皮性異形成 (SD) および上皮内癌 (CIS) において、それぞれ 6.5%, 24.8%, 28.4%, 42.5% および 63.5% であり (Table 3)、SE と MiD 間 ($p<0.05$), MoD と SD 間 ($p<0.05$) および SD と CIS 間 ($p<0.05$) において有意に増加していた (Fig.2)。一方、上皮性異形成例において、異形成層のみに限定したPI は、MiD, MoD, SD および CIS においてそれぞれ順に38.5%, 47.1%, 45.1% および 63.5% であり (Table 3)、SD と CIS 間においてのみ有意に増加していた ($p<0.05$) (Fig.2)。

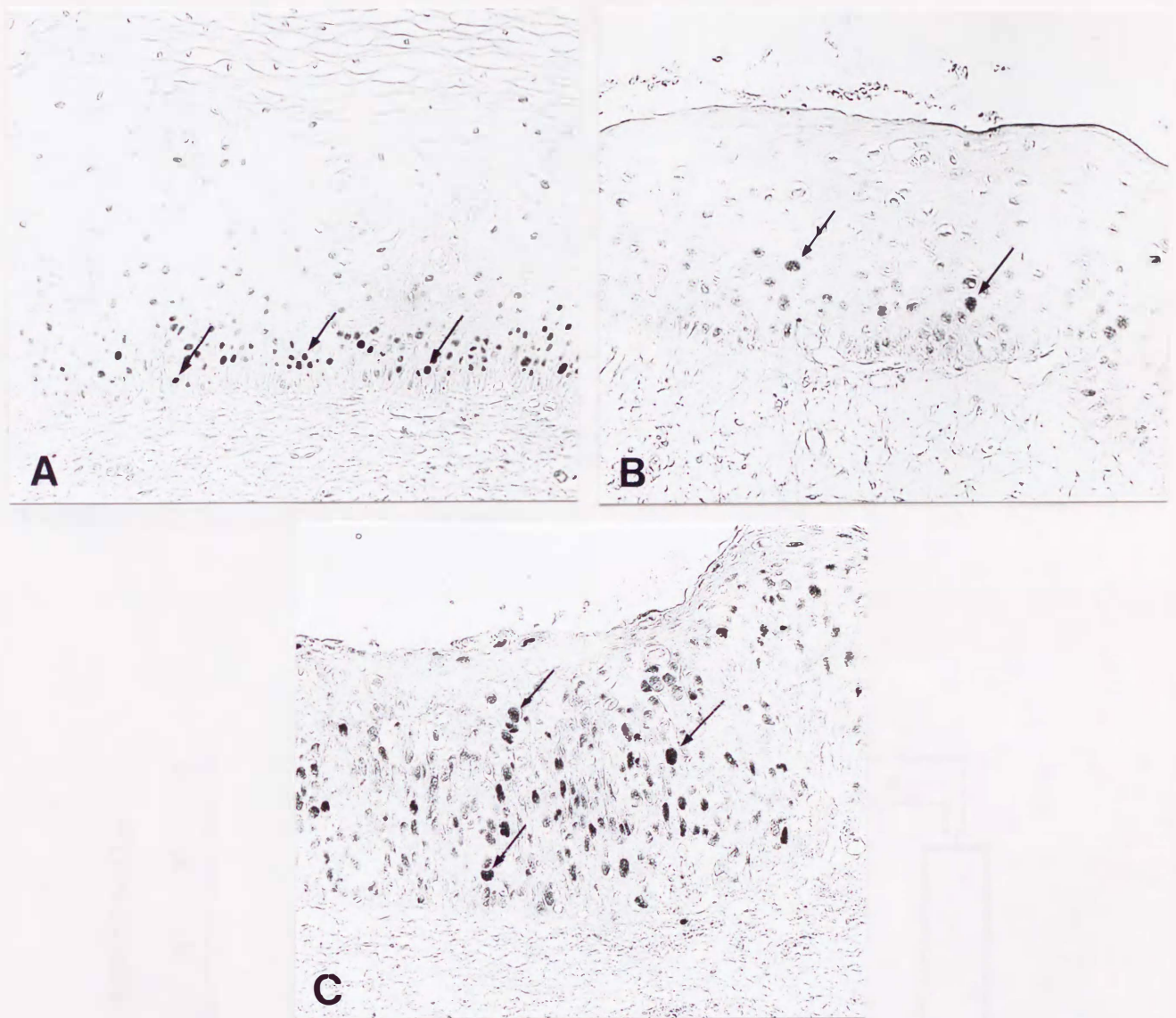


Figure 1. Immunostaining for PCNA in human uterine cervix. Immunoreactive products are detected in the nuclei with granular appearance. Squamous epithelial cells with PCNA positive nuclei (arrows) in cases of normal epithelium (A), mild dysplasia (B) and severe dysplasia (C). PCNA-positive cells are detected in the basal cell layer in normal mucosa (A). Meanwhile PCNA-positive cells are observed in the layer containing dysplastic cells, and are more frequent in severe dysplasia than in mild dysplasia. (A, B and C, x200).

Table 3. Rate of each index in uterine cervix

Histopathology	Entire layer			Dysplastic layer		
	PI(%)	AI(No.)	MI(%)	PI(%)	AI(No.)	MI(%)
SE (n=4)	6.5±0.8	1.5±0.12	0	—	—	—
MiD (n=6)	24.8±5.5	1.6±0.09	0.1±0.05	38.5±4.6	1.7±0.08	0.1±0.04
MoD (n=10)	28.4±2.6	1.8±0.03	0.5±0.11	47.1±3.4	1.9±0.11	0.7±0.09
SD (n=6)	42.5±5.3	2.0±0.28	1.4±0.06	45.1±4.5	2.04±0.27	1.2±0.06
CIS (n=4)	63.5±3.6	1.9±0.16	3.5±0.19	63.5±3.6	1.9±0.16	3.5±0.19

Histopathology (SE=normal stratified squamous epithelium; MiD=mild dysplasia; MoD=moderate dysplasia; SD=severe dysplasia; CIS=carcinoma *in situ*); PI(mean±SE), labeling indexes of PCNA immunostaining ; AI(mean±SE), mean numbers of AgNORs; MI(mean±SE), frequencies of mitotic figures.

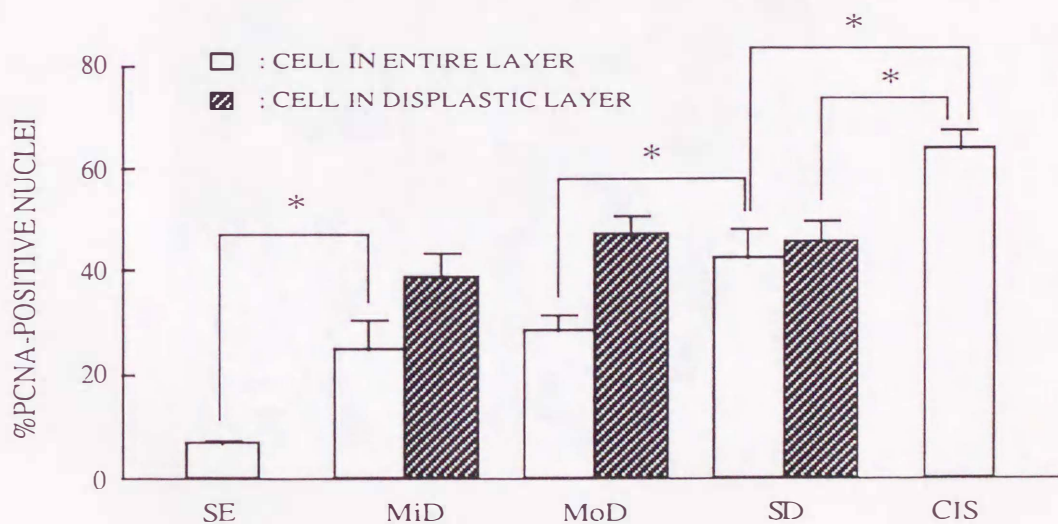


Figure 2. The percentage of PCNA-positive nuclei in normal squamous epithelium (SE), dysplasia (MiD, MoD and SD) and carcinoma *in situ* (CIS). * : $P < 0.05$

4-2. AgNOR染色による検討

AgNOR所見は、上皮細胞の核内に黒点として、全ての症例、および個々の症例におけるほぼ全層の細胞の核内に認められた (Fig.3)。異形成層と非異形成層を含めた上皮全層の各症例群のAIは、Table 3 に示す如くで、MiD と MoD 間 ($p<0.05$) において有意に増加していた (Fig.4)。しかし、SE と MiD 間, MoD と SD 間および SD と CIS 間には有意な差異を認めなかった (Fig.4)。異形成層のみに限定した各症例群の AI は、MiD, MoD, SD および CIS においてそれぞれ順に1.7, 1.9, 2.0 および 1.9 で、異形成度に関連したわずかな増加傾向がみられたが、各群間における有意差を認めなかった (Table 3、 Fig.4)。

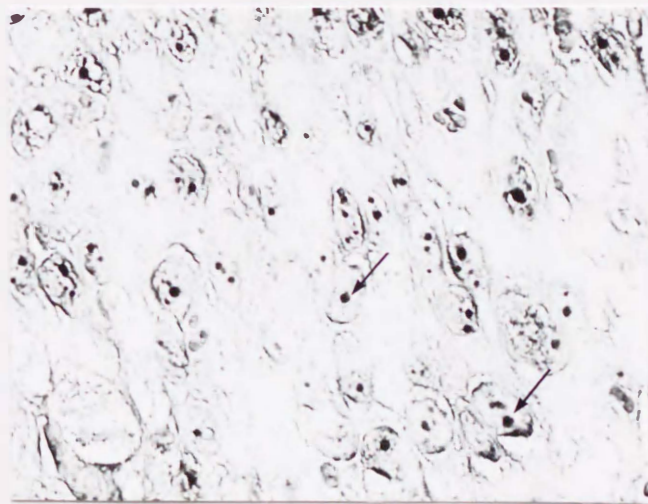


Figure 3. Squamous epithelial cells of uterine cervix stained with AgNOR. Silver-binding black dots are evident in the nuclei of epithelial cells (arrows) in severe dysplasia. (x720)

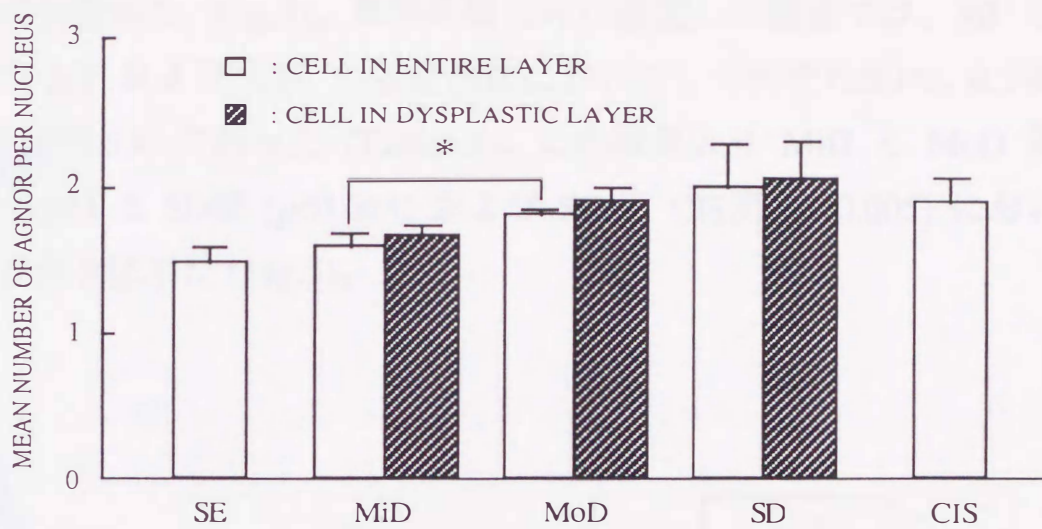


Figure 4. The mean numbers of AgNOR per nucleus in normal squamous epithelium (SE), dysplasia (MiD, MoD and SD) and carcinoma *in situ* (CIS). * : $P < 0.05$

4-3. 核分裂像による検討

異形成層と非異形成層を含めた上皮全層の MI は、MiD, MoD, SD および CIS の各症例群において、それぞれ0.1%、0.5%、1.4% および 3.5% であり、CIS において最高値を示し (Table 3)、各症例群間において有意な増加傾向を認めた (Fig.5)。異形成層のみに限定した検索では、MI は MiD, MoD, SD および CIS の各症例群において、それぞれ0.1%、0.7%、1.2% および 3.5% であった (Table 3)。この結果より MiD と MoD 間 ($p<0.005$), MoD と SD間 ($p<0.005$) および SD と CIS間 ($p<0.005$) において有意な差異を認めた (Fig.5)。

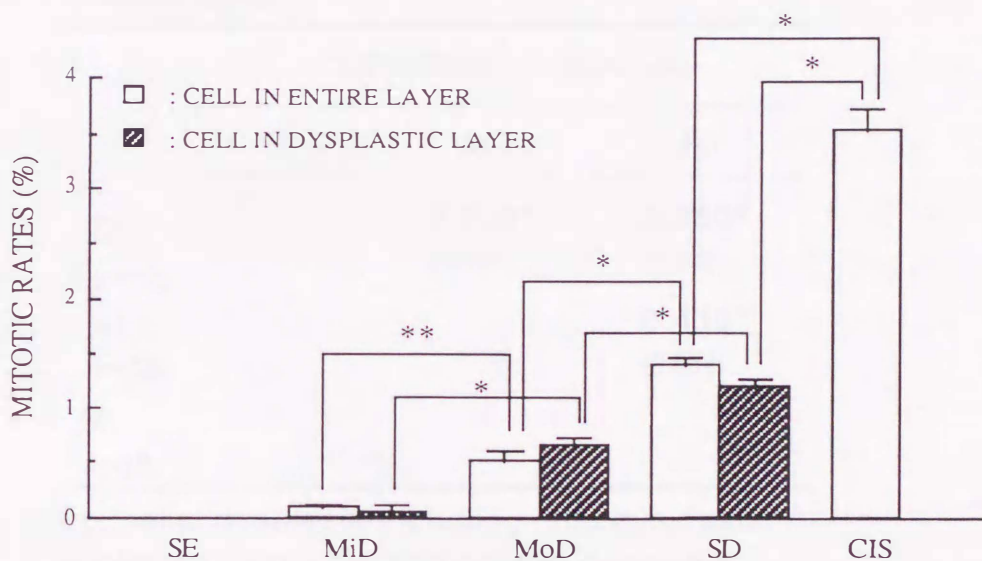


Figure 5. The percentage of mitotic figures in normal squamous epithelium (SE), dysplasia (MiD, MoD and SD) and carcinoma *in situ* (CIS). * : $P<0.005$, ** : $P<0.05$

4-4. 各指標間の関連性

MiD, MoD および SD を合わせたいわゆる上皮性異形成群において異形成層のみに限定した場合の PI, AI および MI は、各指数間に有意な相関を示めした (Table 4)。

Table 4 Correlation among each index of dysplastic layer of epithelial dysplasia in uterine cervix

	Correlation (covariance)		
	PI	AI	MI
PI (n=22)		0.438* (0.031)	0.480* (0.040)
AI (n=22)			0.430* (0.084)
MI (n=22)			

Epithelial dysplasia including mild dysplasia, moderate dysplasia and severe dysplasia;
PI=labeling indexes of PCNA immunostaining;
AI=mean numbers of AgNORs;
MI=frequencies of mitotic figures.
*: $p < 0.05$

4-5. 考察

子宮頸部粘膜病変の上皮全層の検索において、PI と MI の双方の指標は MiD, MoD, SD および CIS と順に有意に増加したが、AI では明らかな増加傾向を示さなかった。これらの結果は、PI と MI の双方の指標が子宮頸部粘膜上皮性異形成における WHO の異形成度分類と密な相関があることを示しており、換言すれば PI と MI の双方の指標から前癌病変としての子宮頸部粘膜の上皮性異形成の異形成度を決定することが可能であることを示唆している。また子宮頸部粘膜における上皮性異形成の異型成度分類が、異型細胞の存在する層の全層に対する割合から決定されていることを考慮すると、本研究における粘膜全層を対象とした PI および MI の検索結果はごく当然のことと思われる。一方、AI については各病変群との間に有意な差異を認めなかったことより、AgNOR による検索では異形成度は決定できないことが明らかである。Chiら²¹⁾は、子宮頸部粘膜の上皮性異形成および上皮内癌における核分裂像数は正常上皮から軽度、中等度および高度上皮性異形成さらに上皮内癌まで段階的増加を示している。また Rowlands²⁶⁾は AgNOR 染色による子宮頸部粘膜病変の検索で正常と軽度および中等度上皮性異形成間に有意差を認めないが、高度上皮性異形成および上皮内癌においては多少増加傾向を示したと報告している。しかしながら彼の報告では AgNOR は組織変化に伴う明らかな傾向が得られないと結論づけている。本研究における PI、MI および AI の検索結果はこれらの報告を支持する。しかしながら子宮頸部粘膜上皮性異形成の異形成層のみに限定した PI の検索では上皮性異形成の各群の間に有意な差異を認められず、上皮性異形成における各群の組織学的所見の差異、すなわち上皮性異形成層の厚さの違いは単なる病期の違いを再現している可能性も否定できない。しかし、異形成層に限定した各群の MI についての検索結果では、異形成度と相関して増殖活性度の有意な増加が認められた。また異形成層のみに限定した PI と MI の相

関係数の検索結果より両指標に正の相関があった。これらの結果より各群における異形成層のみのPIには有意差はないものの細胞の増殖活性は増加していると思われる。このPIとMIの相反する結果は、PIが細胞周期におけるG1後期からS期までに出現する蛋白を検出しているのに対し、MIは直接M期を再現しており、このような細胞周期における両者の出現時期および長さの違いが双方の出現頻度の違いに影響していると考えられる²⁷⁾。従って、子宮頸部粘膜の上皮性異形成における、より正確な増殖活性度診断には、PIとMIの双方の指標を用いた診断が重要であり、単独指標で評価するのは増殖活性度診断に偏りが生ずる可能性が考えられる。また、PIとMI共にSDとCIS間に明らかに有意な増加を認められた。従って上皮内癌は高度上皮性異形成と比較しても明らかに高い増殖活性度を有しており、この結果から前癌病変と癌との間には、大腸癌の発生の経過における遺伝子レベルの変化に代表されるような、細胞機能の本質的な変化が起こっている可能性が示唆される²⁸⁾²⁹⁾。以上の結果より、子宮頸部粘膜上皮性異形成の異形成度の判定に、PIとMIを指標とした検索は非常に有用であるが、AIについては異形成度との関連性は少ないと考えられた。

5. 口腔粘膜考察上皮性異形成における細胞増殖活性度

5-1. PCNA免疫組織化学染色による検討

PCNA陽性所見は子宮頸部の場合と同様に、核内に顆粒状を呈し、異形成を伴わない白板症 (LP), 上皮性異形成 (ED) および扁平上皮癌 (SCC) 各症例群の全ての症例に認められた。PCNA 陽性細胞の分布は、LP では主に基底細胞層に認められ (Fig.6A)、ED では基底細胞層と有棘細胞層の下層に拡がっている症例 (Fig.6B) から上皮のほぼ全層に拡がっている症例 (Fig.6C) まで多様な分布様式を呈していた。SCC では壊死部を除いた腫瘍胞巣にほぼ均一に分布しているが、特に浸潤先端部に高頻度にみられる傾向を示した (Fig.6D)。PI は、LP, ED および SCC の各症例群において順に23.6%, 34.5% および 64.7% であり (Table 5)、LP と ED 間 ($p<0.005$) および ED と SCC 間 ($p<0.001$) において有意に増加していた (Fig.7)。

Table 5. Rate of each index in oral mucosa

Histopathology	PI(%)	AI(No.)	MI(%)
LP (n=12)	23.58 ± 1.89	1.83 ± 0.19	0.1 ± 0.03
ED (n=24)	34.50 ± 2.30	2.21 ± 0.13	0.67 ± 0.11
SCC (n=24)	64.72 ± 2.91	4.14 ± 0.18	1.14 ± 0.11

Histopathology (LP=leukoplakia without any dysplastic changes; ED=epithelial dysplasia; SCC=squamous cell carcinoma);

PI(mean ± SE)=labeling indexes of PCNA immunostaining ;

AI(mean ± SE)=mean numbers of AgNORs;

MI(mean ± SE)=frequencies of mitotic figures.

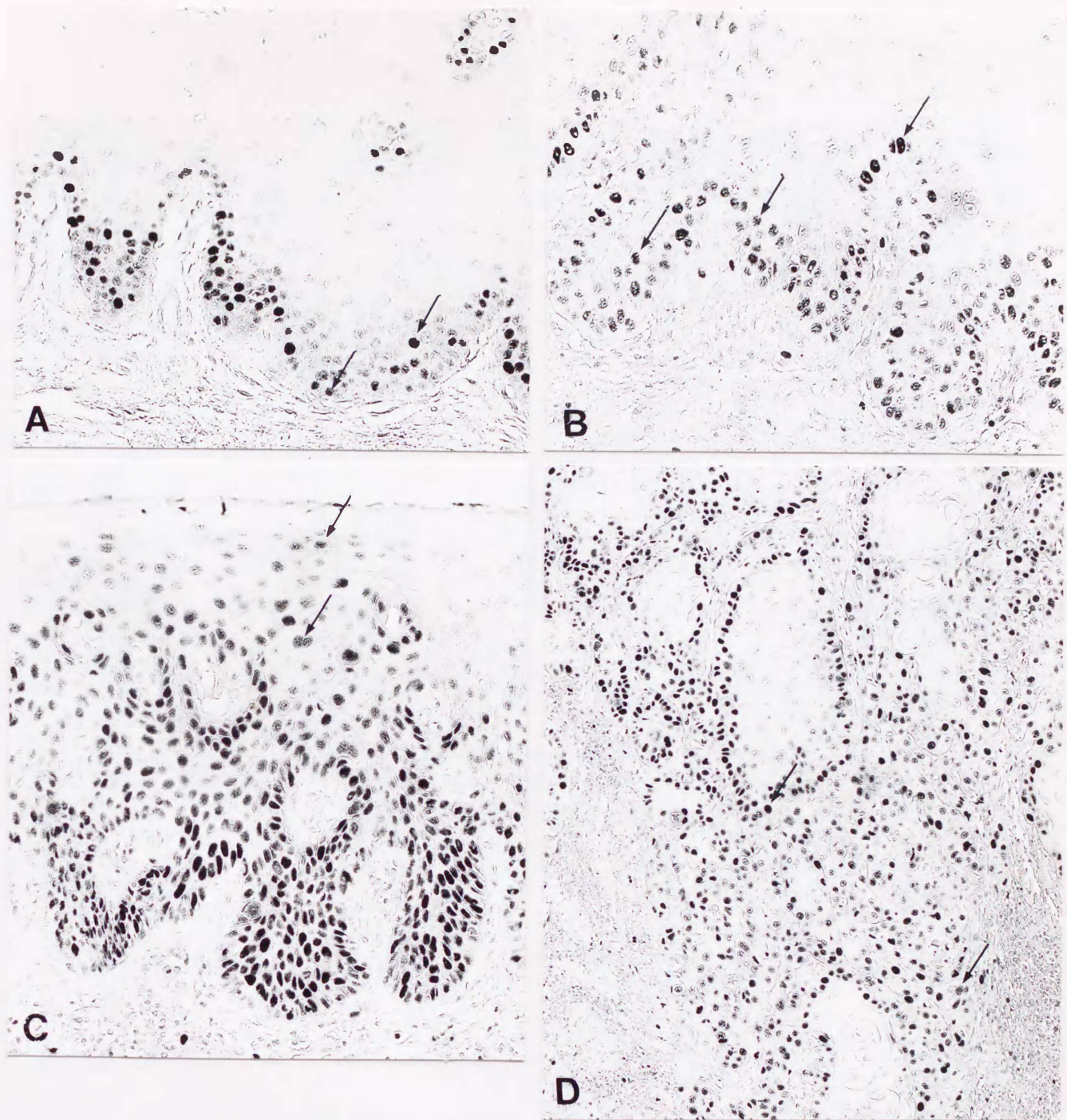


Figure 6. Immunostaining for PCNA in human oral mucosa. Immunoreactive products are detected in the nuclei with granular appearance. Squamous epithelial cells with PCNA positive nuclei (arrows) in cases of leukoplakia without any dysplastic changes (A), epithelial dysplasia (B and C) and squamous cell carcinoma (D). PCNA-positive cells are restricted to the basal cell and lower spinous layers (A). PCNA-positive cells increase in dysplasia (B and C) and carcinoma (D). (A, B, C and D, x170)

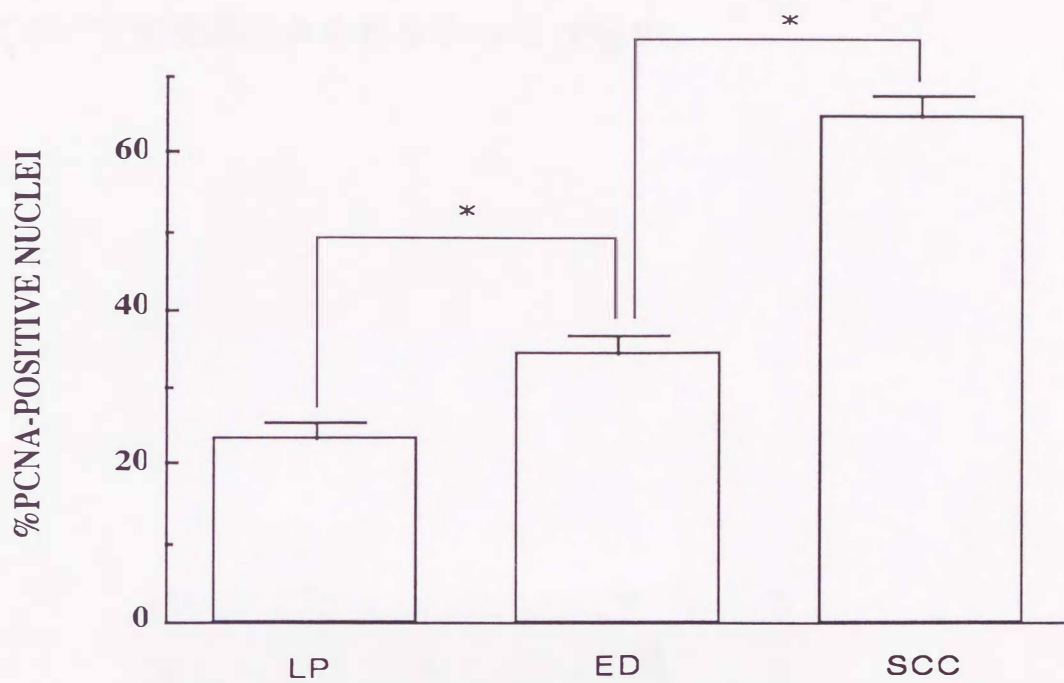


Figure 7. The percentage of PCNA-positive nuclei in leukoplakia without any dysplastic changes (LP), epithelial dysplasia (ED) and squamous cell carcinoma (SCC). *: $p < 0.005$

5-2. AgNOR染色による検討

AgNOR所見も子宮頸部と同様に、上皮細胞の核内に黒点として全ての症例に認められた (Fig.8)。各群の AI は、Table 5 に示す通りで、ED と SCC 間 ($p<0.001$) において有意に増加していた (Fig.9)。しかし、LP と ED 間において有意差はみられなかった (Fig.9)。

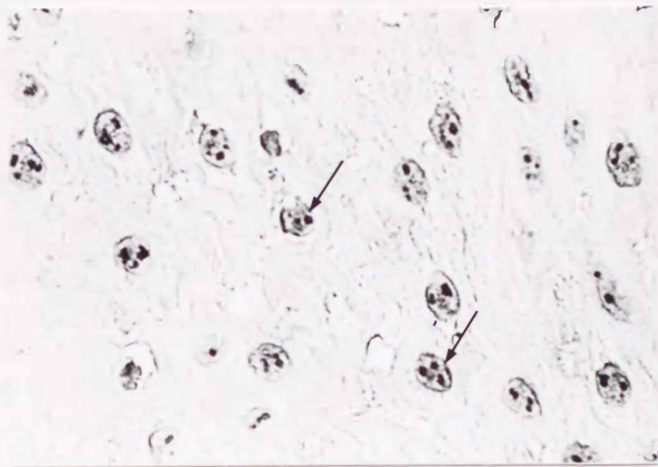


Figure 8. Squamous epithelial cells of dysplastic oral mucosa stained with AgNOR. Silver-binding black dots are evident in the nuclei of epithelial cells (arrows). (x670)

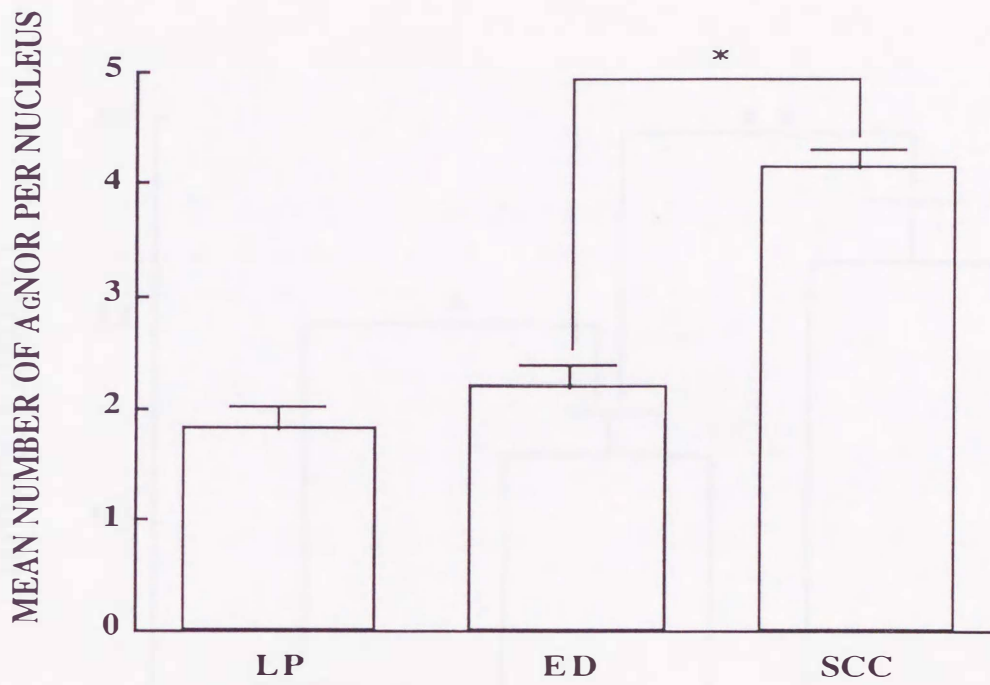


Figure 9. The mean numbers of AgNOR per nucleus leukoplakia without any dysplastic changes (LP), epithelial dysplasia (ED) and squamous cell carcinoma (SCC).

* : $p < 0.005$

5-3. 核分裂像による検討

MI は、LP, ED および SCC の各群において順に 0.07%、0.67% および 1.15% であり、SCC において最高値を示した (Table 5)。また、各群間において有意な差異を認めた (Fig.10)。

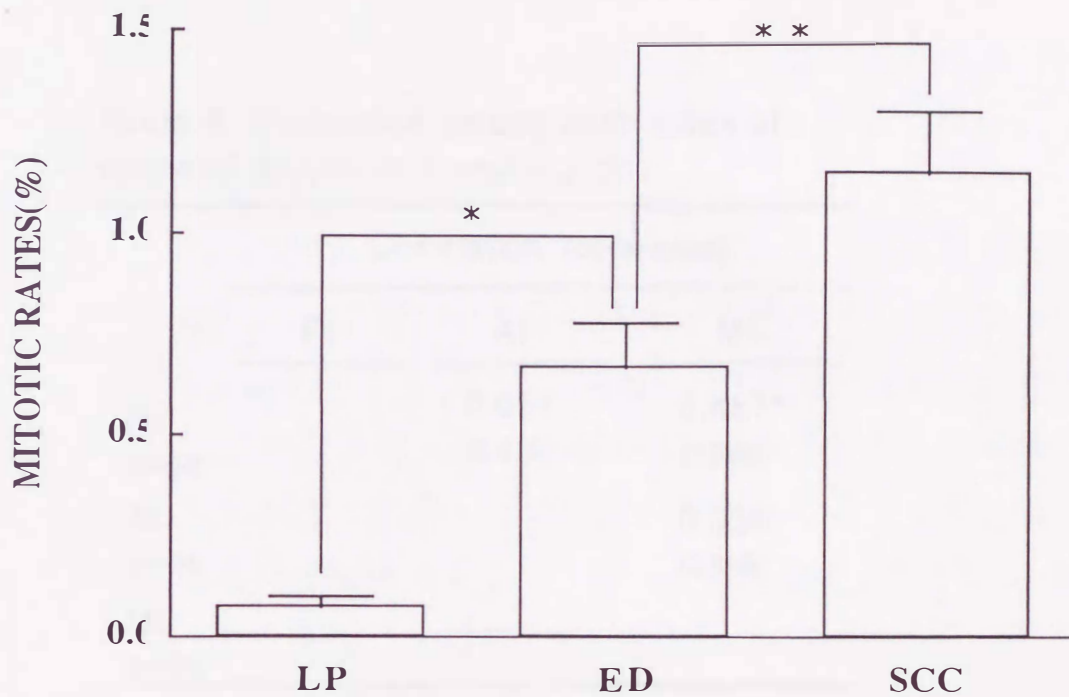


Figure 10. The percentage of mitotic figures in leukoplakia without any dysplastic changes (LP), epithelial dysplasia (ED) and squamous cell carcinoma (SCC).

* : $p < 0.005$, ** : $p < 0.05$

5-4. 各指標間の関連性

EDにおける PI、AI および MI について各指数間の相関を検索した結果、PI と MI の指数間に有意な相関を認めたが、他の指数間では有意な相関を示めさなかった (Table 6)。

Table 6 Correlation among each index of epithelial dysplasia in oral mucosa

	Correlation (covariance)		
	PI	AI	MI
PI (n=24)		0.057 (0.416)	0.487* (3.080)
AI (n=24)			0.096 (0.035)
MI (n=24)			

PI=labeling indexes of PCNA immunostaining ;

AI= mean numbers of AgNORs;

MI=frequencies of mitotic figures.

*: $p < 0.05$

5-5. 考察

口腔粘膜病変の検索において、PI と MI は LP, ED および SCC と順に有意に増加したが、AI では ED と SCC 間にのみ増加傾向を示した。さらに、上皮性異形成の PI と MI 間の相関係数より、両指標間に明らかな相関があることがわかった。Tsuji¹¹⁾は、口腔粘膜および皮膚における扁平上皮癌および前癌病変（白板症, 老人性角化症, ボウエン病）の PCNA 陽性率は正常粘膜より有意に高い値を示しており、前癌病変における上皮の異形成の程度は PCNA 陽性率と緊密な関連性を有しているのではないかと報告している。本研究においても同様の結果が得られ、PI の指標は口腔粘膜上皮性異形成の異形成を伴わない白板症より高く、扁平上皮癌より低い事が明らかであった。

AI については、PI および MI と同様に ED と SCC との間に有意な差を認めた。しかしながら、AI は PI あるいは MI と明らかな相関性を示さなかった。Wamkulasuriya¹⁴⁾は口腔角化症, 上皮性異形成および扁平上皮癌の AgNOR 数に有意な増加傾向があったと報告しており、同時に各病変の AgNOR 数はかなり重複しており診断に有効ではないが、高い指数をしめす症例は扁平上皮癌であることが多いと結論付けている。本研究においても扁平上皮癌は上皮性異形成に比較して高い指数を示した。これは AgNOR が蛋白合成を含めた細胞全体の活性に関連した指標であることより、上皮性異形成と扁平上皮癌では細胞の増殖のみならず細胞全体の活性化に明らかな違いがあることが示唆される²⁰⁾²¹⁾²²⁾。しかしながら、子宮頸部病変と口腔粘膜病変との間に若干の相違がみられた。即ち、口腔粘膜においては ED と SCC との間に AI の有意な差を認めたが、子宮頸部においては、SD と CIS との間に有意な差異を認めなかった。この生物学的理由については臓器特異性による違いはもちろんのこと、今回検索の対象とした癌組織は、比較の対象が子宮頸部では高度異形成群であり、一方口腔粘膜では上皮性異形成群全体であることが考えられ

る。さらに子宮頸部では上皮内癌であり、口腔粘膜では浸潤癌であることから、このAIの違いは前癌病変との関連性よりも、むしろ癌組織における悪性度との関連性が強いのではないかと推測される¹⁹⁾²²⁾。

以上の結果から口腔粘膜上皮性異形成における増殖活性度の指標としてPI と MI は有効であるが、AI は増殖活性度のみを示す指標としては、やや不適切と結論づけられる。さらに口腔粘膜の上皮性異形成病変における異形成度診断は、上皮組織の形態が子宮頸部粘膜ほど単純ではなく複雑な上皮脚の延長を認め、また異型細胞の存在様式が子宮頸部粘膜の病変のように規則的な層状を示すことなく、不規則に粘膜上皮内に分布していることなどから、判定に困難が伴うことがしばしばある。しかしながら子宮頸部粘膜上皮性異形成におけるPI と MI の検索結果より、異形成度は増殖活性度と相関しており、さらに両上皮性異形成ともPI とMI 間に正の相関性があると示していた。従って口腔粘膜上皮性異形成の異形成度の検索にPI とMI の両指標による診断が有効と考えられる。

6. 口腔粘膜考察上皮性異形成における異形成度と細胞増殖活性との関係

6-1. 細胞増殖活性と組織学的所見との関連性

口腔粘膜上皮性異形成における PI と MI の相関より、PI と MI 共に各平均値より高値を示す症例 (H-ED) 群と PI と MI 共に各平均値より低値を示す症例 (L-ED) 群間において病理組織学的所見の構成要素について検索した (Fig.11)。すなわち、WHO Collaborating Centre (1978) にて定められた病理組織学的項目より、指標として使用した「有糸分裂像の増数」の項目を除外した病理組織構成要素の各項目のうち (Table 1)、「基底細胞の極性の喪失」、「核細胞質比の増大」、「細胞の多形性」および「大きな核小体」などの組織学的所見が H-ED 群における主要な組織学的構成要素であった ($P<0.05$) (Table 7)。

Table 7 The correlation between histologic findings and proliferative activity in epithelial dysplasia

Histologic components	H-ED (%) (n=5)	L-ED (%) (n=10)	Significant differences
(1) Loss of polarity of the basal cells	5 (100)	1 (10)	$p<0.005$
(2) The presence of more than one layer of cells having a basaloid appearance	2 (40)	2 (20)	N.S.
(3) An increased nuclear-cytoplasmic ratio	5 (100)	3 (30)	$p<0.05$
(4) Drop-shaped rete processes	3 (60)	8 (80)	N.S.
(5) Irregular epithelial stratification	2 (40)	1 (10)	N.S.
(6) The presence of mitotic figures in the superficial half of the epithelium	0 (0)	0 (0)	N.S.
(7) Cellular pleomorphism	3 (60)	0 (0)	$p<0.005$
(8) Nuclear hyperchromatism	0 (0)	4 (40)	N.S.
(9) Enlarged nucleoli	4 (80)	1 (10)	$p<0.005$
(10) Reduction of cellular cohesion	0 (0)	3 (30)	N.S.
(11) Keratinization of single cells or cell groups in the prickly layer	2 (40)	2 (20)	N.S.

Histologic components, histologic components of epithelial dysplasia established by WHO Collaborating Centre; H-ED=the cases of higher indexes both PI (>34.5%) and MI (>0.67%) in epithelial dysplasia; L-ED=the cases of lower indexes both PI (<34.5%) and MI (<0.67%) in epithelial dysplasia (MI, frequency of mitotic figures; PI, labeling index of PCNA immunostaining).

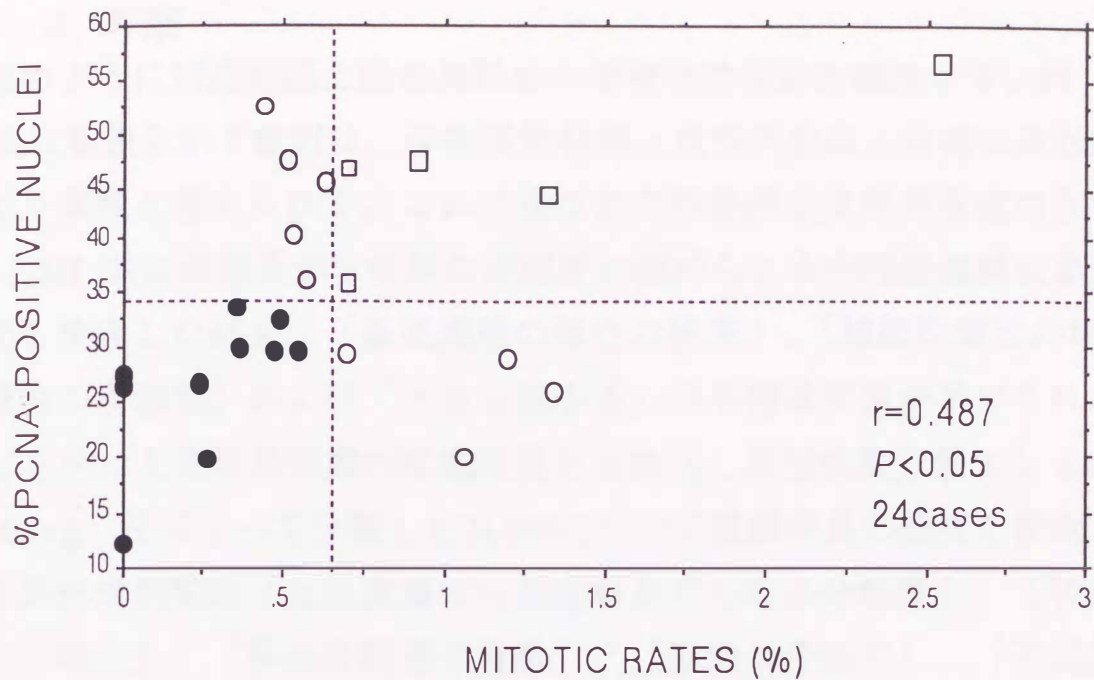


Figure 11. Correlation between labeling index of PCNA immunostaining (PI) and frequency of mitotic figures (MI); open squares (□) are cases of higher indexes both PI (>34.5%) and MI (>0.67%); closed circles (●) are cases of lower indexes both PI (<34.5%) and MI (<0.67%).

6-2. 考察

前述のように口腔粘膜上皮性異形成の増殖活性度診断結果より、PI とMI共に高値を示す症例は、子宮頸部粘膜上皮性異形成と同様に異形成度もより高度と考えられる。これに基づき口腔粘膜上皮性異形成のうち、PI とMI 共に高値を示す症例に高頻度に認められる病理組織構成要素の傾向を検索した結果、「基底細胞の極性の喪失」、「核細胞質比の増大」、「細胞の多形性」および「大きな核小体」の各構成要素が挙げられた。Katz ら³⁰⁾は上皮性異形成の組織所見を点数化し異形成度分類する Smith-Pindborg 法によって分類した214例について組織所見の頻度を検索し、高度異形成病変は「上皮表層から基底層までの有糸分裂像」、「核細胞質比の増大」、「有糸分裂像の増数」、「細胞の多形性」、「不規則な上皮の重層」、「基底細胞の過形成」、「極性の喪失」および「細胞結合の脆弱化」の所見を高頻度に認めると報告している。また、Grässel-Pietrusky ら³¹⁾は口腔白板症のフローサイトメトリーによる検索にて高度異形成病変において aneuploidy を示すが、軽度および中等度異形成病変では認めないと報告している。これより高度異形成病変では核の本質的変化を表現した組織形態学変化を示す可能性が高いと思われる。増殖活性度による本研究の結果は、「基底細胞の極性の喪失」、「核細胞質比の増大」、「細胞の多形性」および「大きな核小体」などの組織学的所見が増殖活性度の高い症例に高頻度にみられるもので、これらはSmith-Pindborg法の異形成度分類によるKatzら³⁰⁾の結果の組織所見に含まれており、また核の変化を表す組織形態学形態を含んでおりGrässel-Pietrusky ら³¹⁾の口腔白板症のフローサイトメトリーによる検索結果とも相関すると思われる。また上記の各組織学的構成要素は癌細胞にも共通した所見でもある事などを考え合わせれば、日常の病理組織診断におけるこれらの所見の有無は、病変の病期や予後を判定するうえで極めて有用な手段と成りうると考えられる³²⁾。すなわち、従来より明確な基準のない口腔

粘膜における上皮性異形成の異形成度を診断する際に増殖活性度を指標とした検索は臨床病理学上、極めて有用であり、この検索結果から導き出された組織学的構成要素は高度上皮性異形成に関連した所見であることが判明した。また、本研究の結果は口腔粘膜上皮性異形成の定義ならびに異形成度分類の設定に重要な示唆を与えらる。

7. 総括ならび結論

口腔および子宮頸部粘膜の上皮性異形成において細胞増殖の指標として免疫組織化学的染色法による PCNA 陽性率, AgNOR による黒点数および核分裂像の出現率を使用し両病変の増殖活性度を検索し、口腔粘膜上皮性異形成の増殖活性度に 관련된病理組織構成要素を調べ、以下の結果を得た。

1、子宮頸部粘膜の上皮性異形成では PCNA 陽性率と核分裂像出現率より異形成度に 관련된増殖活性度の増加を認め、また上皮内癌は高度上皮性異形成と比較して明らかに高い増殖活性度を示した。また、AgNOR 数は異形成度に 관련된増加を示しているものの有意な差異は認めなかった。

2、PCNA 陽性率と核分裂像出現率より求めた口腔粘膜上皮性異形成の増殖活性度は、異形成を伴わない白板症より高く、また扁平上皮癌より低かった。それぞれの症例群間に明らかな有意差を認めた。また、AgNOR 数も扁平上皮癌は上皮性異形成と比較して明らかに高い値を示した。

3、口腔粘膜の上皮性異形成において高い増殖活性度を示す症例は、「基底細胞の極性の喪失」、「核細胞質比の増大」、「細胞の多形性」および「大きな核小体」の構成要素を有意に呈する傾向があった。

4、以上より口腔粘膜上皮性異形成の異形成度の判定には PCNA 免疫染色と核分裂像を指標とした増殖活性度の検索が有用であり、この検索結果から導き出された組織学的構成要素は高度上皮性異形成に関連した所見と考えられた。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、始終御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました九州大学歯学部口腔病理学講座の坂井英隆教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に御援助をいただいた九州大学歯学部口腔外科第一講座の田代英雄教授ならびに千早病院婦人科の神田修治博士に深く感謝の意を表します。さらに、統計処理について御指導いただいた九州大学教養部の阪口紘治教授ならびにコンピューター画像解析処理について御援助いただいた九州大学歯学部歯科補綴学第二講座の竹下文隆講師に深く感謝いたします。最後に、多くの御協力をいただいた九州大学歯学部口腔病理学教室諸氏に心からお礼申し上げます。

9. 文献

- 1) Kobayashi I, Matsuo K, Ishibashi Y, et al.: The proliferative activity in dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and silver-binding argyrophilic nucleolar organizer region staining..Human Path 25:198-202, 1994.
- 2) Pindborg JJ: Oral Precncer, in Barnes L (ed): Surgical Pathology of the Head and Neck. New York, Marcel Dekker, 1985, pp299-315.
- 3) Fox H, Buckley CH: The female genital tract and ovaries, in McGee JO'D, Isaacson PG, Wright NA (ed): Oxford Textbook of Pathology. Oxford, Oxford University Press, 1992, pp1589-1591.
- 4) Poulsen HE, Taylor CW: Histological typing of female genital tract tumours. Geneva, World health organization, 1975, pp55-57.
- 5) Dallenbach-Hellweg G, Poulsen H: Atlas of histo-pathology of the cervix uteri. Heidelberg, Springer-Verlag, 1990, pp76-108.
- 6) Wahi PN, Cohen B, Luthra UK et al.: Histological typing of oral and oropharyngel tumours. Geneva, World health organization, 1971, pp15-27.
- 7) WHO Collabating Centre for Oral Precancerous Lesions: Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. Oral Surg 46: 518-539, 1978.
- 8) Carter RL, Gusterson BA: Preneoplasia, in McGee JO'D, Isaacson PG, Wright NA (ed): Oxford Textbook of Pathology. Oxford, Oxford University Press, 1992, pp592-597.

- 9) Chi C, Rubio C, Lagerlof B: The frequency and distribution of mitotic figures in dysplasia and carcinoma in situ. *Cancer* 39:1218-1223, 1977.
- 10) Robbins BA, Vega D, Ogata K, et al.: Immuno-histochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignances. *Arch Pathol Lab Med* 111:841-845, 1987.
- 11) Tsuji T, Shrestha P, Yamada K, et al.: Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre-malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin: an immunohistochemical study. *Virchows Archiv [A]* 420:377-383, 1992.
- 12) Chomette GP, Auriol MM, Labrousse F, et al.: Mucoepidermoid tumors of salivary glands:historognostic value of NORs stained with AgNOR technique. *J Oral Pathol* 20:130-132, 1991.
- 13) Cabrini RL, Schwint AE, Mendez A, et al.: Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol* 21:275-279, 1992.
- 14) Warnakulasuriya KAAS, Johnson NW: Nucleolar organizer region (NOR) ditribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 22: 77-81, 1993.
- 15) Celis JE, Celis A: Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin pro-liferating cell nuclear antigen in cultured cells:Sub-division of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3262-3266, 1985.
- 16) Lee MYWT, Tan C-K, Downey KM, et al.: Further studies on calf thymus DNA polymerase d purified to homogeneity by a new procedure. *Biochemistry* 23:1906-1913, 1984.

- 17) Troster H, Spring H, Meissner B et al.: Structural organization of an active, chromosomal nucleolar organizer region (NOR) identified by light microscopy, and subsequent TEM and STEM electron microscopy. *Chromosoma* 91:151-163, 1985.
- 18) Crocker J: Nucleolar organiser regions, in Underwood JCE (ed): *Pathology of the nucleus*. London, Springer-Verlag, 1990, pp 91-149.
- 19) Sano K, Takahashi H, Fujita S, et al.: Prognostic implication of silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol* 20:53-56, 1991.
- 20) Crocker J, Macartney JC, SmithPJ: Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 154:151-156, 1988.
- 21) Sasano H, Saito Y, Sasano N, et al.: Nucleolar organizer regions in human adenocortical disorders. *Mod Pathol* 3:591-595, 1990.
- 22) Crocker J: Nucleolar organizer regions (NORs) in neoplasms, in McGee JO'D, Isaacson PG, Wright NA (ed): *Oxford Textbook of Pathology*. Oxford, Oxford University Press, 1992, pp586-590.
- 23) Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162:285-294, 1990.
- 24) Ploton D, Bobichon H, Adnet J-J: Ultrastructural localization of NOR in nucleoli of human breast cancer tissues using a one-step Ag-NOR staining method. *Biol. Cell* 43:229-232, 1982.

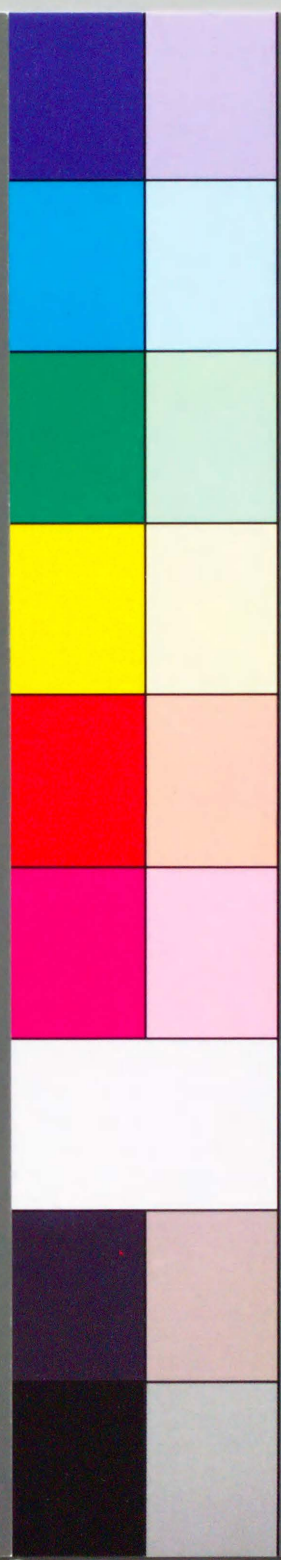
- 25) Ploton D, Menager M, Jeannesson P, et al.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 18:5-14, 1986.
- 26) Rowlands D: Nucleolar organising regions in cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 41:1200-1202, 1988.
- 27) Alberts B, Bray D, Lewis J, et al.: *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Publishing, Inc., 1989, pp727-761.
- 28) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton S, et al.: Genetic alterations colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532, 1988.
- 29) Miyaki M, Seki M, Okamoto M, et al.: Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 50:7166-7173, 1990.
- 30) Katz HC, Shear M, Altini M: A critical evaluation of epithelial dysplasia in oral mucosal lesions using the Smith-Pindborg method of standardization. *J Oral Pathol* 14: 476-482, 1985.
- 31) Grässel-Pietrusky R, Deinlein E, Hornstein OP: DNA-ploidy rates in oral leukoplakias determined by flow-cytometry. *J Oral Pathol* 11:434-438, 1982.
- 32) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (eds): *Neoplasia in Pathologic Basis of Disease*. 4th edition, W.B.Saunders Company, 1989, pp239-246.



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak