

〔原著〕 松本歯学 21 : 208~214, 1995

key words : 核小体形成体 — 細胞増殖 — 腫瘍性病変 — 非腫瘍性病変

## 各種増殖性病変における核小体形成体の動態

武井則之, 川上敏行, 枝 重夫

松本歯科大学 口腔病理学教室 (主任 枝 重夫 教授)

Dynamics of Nucleolar Organizer Regions in Varied Proliferating Lesions

NORIYUKI TAKEI, TOSHIYUKI KAWAKAMI and SHIGEO EDA

*Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental College*

*(Chief : Prof. S. Eda)*

### Summary

We compared the number of NORs in necrotizing sialometaplasia (NSM), hyperkeratosis (HYP) and low-keratinizing squamous cell carcinoma (SCC) by a fixing-substitution method. As a result, the mean numbers of NORs in NSM were  $7.1 \pm 0.2$  (mean  $\pm$  S. E.), HYP,  $10.2 \pm 0.3$  and SCC,  $23.8 \pm 0.7$ .

There was a significant difference between the number of NORs of NSM and that of HYP in t-test analysis. Similar tendencies were observed in the relationship between HYP and SCC, and between SCC and NSM.

We thought that NORs is a good index to evaluate the potency for proliferation of cells rather than an index to discriminate benign or malignant tumors.

### 緒 言

核小体形成体 (Nucleolar Organizer Regions : 以下 NORs と略す) は, その数や大きさ, 形態が細胞の増殖能を密接に反映するといわれており<sup>1,2)</sup>, 1980年に Howell and Black によって, その染色法についての詳細が明らかにされた<sup>3)</sup>. しかし, 染色法や計測の対象物について問題があり, 我々はそれについて既に報告した<sup>4)</sup>. この中で染色結果から細胞核内の NORs を計測することに

よって, 増殖期にある病変中の細胞の増殖能をより客観的に判断できる可能性があることについても示唆した.

さて, 壊死性唾液腺化生 (Necrotizing sialometaplasia : 以下 NSM と略す) は, Abrams (1973)<sup>5)</sup> によって, 初めてその臨床的ならびに病理組織学的特徴が報告された病変で, 臨床的にも病理組織学的にも悪性腫瘍との鑑別が非常に困難である. 病理組織学的には扁平上皮癌や粘表皮癌または, 腺様嚢胞癌などと類似した組織像を呈し, したがって H-E 染色による所見のみでは診断に苦慮する. また, 臨床的には, 扁平上皮癌を呈する病変でも, 病理組織学的には異型増殖などの良悪性の境界病変であったり, 他の腫瘍類似病変で

本論文の要旨は第 39 回松本歯科大学学会例会 (1994 年 11 月 19 日, 塩尻市) において発表された. (1995 年 7 月 7 日受理)

あることも多く、病理組織学的所見のみでは客観的な判断が困難な場合が多い。

そこで、我々は Howell and Black の原法を一部改変した改良鍍銀染色法の 1 つである、定着一金置換法<sup>4)</sup>を用いて NSM と、前癌病変の 1 つとして過角化症(以下 HYP と略す)を、腫瘍性病変の代表として扁平上皮癌(以下 SCC と略す)について、それらの NORs を統計学的に比較検討したので、その概要を若干の文献の考察を加えて報告する。

### 材料および方法

#### 1. 検索材料

検索に用いた材料は当教室で取り扱った臨床検査材料のうち、31歳男性の右側口蓋部に発生した NSM (MDC 115-88) (図 1, 2), 63歳男性の右側舌下部に発生した HYP (MDC 048-93) (図 3) と、77歳男性の下顎右側小臼歯部相当歯槽粘膜に発生した弱角化性の SCC (MDC 079-93②) (図 4) の計 3 症例で、摘出後、直ちに 10% 中性緩衝ホルマリン溶液中に 24 時間固定されたものである。

#### 2. 実験方法

摘出した材料は通法にしたがって、それぞれ 4  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製し、H-E 染色ならびに先に報告した改良鍍銀染色法(定着一金置換法<sup>4)</sup>)を施してそれぞれの病変における NORs を検索した。すなわち、2%ゼラチン 1%蟻酸水溶液と 50%硝酸銀水溶液を 1:2 の割合で混合し、0.03  $\mu\text{m}$  のミリポアフィルター (Millex-GV<sup>®</sup>: 日本 MILLIPORE, Ltd. 東京) で濾過した Ag-NORs 液に暗室中で 25 分間反応させた後、1 分間水洗し、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液で 5 秒間定着させた。その後、流水で 15 分間水洗し、0.1%塩化金水溶液に 5 秒間浸漬・置換させ、再び流水で 15 分間水洗し、その後アルコール系列で脱水し、透徹・封入後、油浸レンズ下で鏡検した。そして、それぞれの症例について無作為に選んだ 100 個の細胞核内の微細顆粒状の dots を計測し、その平均値を NORs 数として、t-検定を行い、3 種の病変の NORs 数をそれぞれ統計学的に比較検討した。

### 結 果

#### 1. Ag-NORs 染色所見

##### ① NSM (壊死性唾液腺化生)

個々の細胞の核は比較的大きさが均一で、NORs はその中に 4~7 個の微細顆粒状の dots として観察され(図 5 矢印)、また、これらの dots が 1 つの塊となって核内に 1~3 個存在しているものが多く観察された(図 5 楔印)。なお、塊状のものは大部分が類円形で、比較的小さいものが多かった。

##### ② HYP (過角化症)

やや腫大した核は、大部分は類円形であったが、一部に楕円形のものが認められた。これらの中に NORs はやはり、微細顆粒状の dots として観察された(図 6 矢印)。また、1 つの核内に 20 個以上の dots が観察されるものも認められた。また、NSM でのそれと同様にこれらの dots が集合して 1 つの塊となっているものも観察されたが(図 6 楔印)、この数は 1~3 個であり、この塊状物の形態は棍棒状や線状等の不整な形態の大きなものが多くなり、中には微細顆粒状の dots が粉碎されたと思われるようなものも観察された。

##### ③ SCC (扁平上皮癌)

長楕円形または類円形の核内の微細顆粒状の dots は塊状の形態をとらずに散在しているものが多く観察された(図 7 矢印)。さらに、dots の塊状のものは 1~4 個であり、それは NSM, HYP のそれに比べて大きかった。また形態は類円形のもの、棒状のもの等、様々であった(図 8 楔印)。

#### 2. NORs 数の計測結果

NORs 数は NSM で  $7.1 \pm 0.2$  (mean  $\pm$  SE), HYP で  $10.2 \pm 0.3$ , SCC で  $23.8 \pm 0.7$  となり、これらを Welch の t-検定によって比較したところ、NSM, HYP, SCC の順で漸次増加し、それぞれ互いに危険率 1% で有意差が認められた(図 9)。

### 考 察

冒頭でも述べたように、NSM は病理組織学的所見のみでは診断が非常に困難な病変の 1 つであり、通常病理組織学的所見のみからでは個々の細胞の増殖能を客観的に判断することはできない。また、上皮性異形成病変などでも同様に診断に苦慮する場合があります、このような場合、今日では免疫組織学的手法によって PCNA (増殖期細胞核抗原) を染色し、これによる陽性細胞率などを参考にすることはできる。しかし、この手法は、

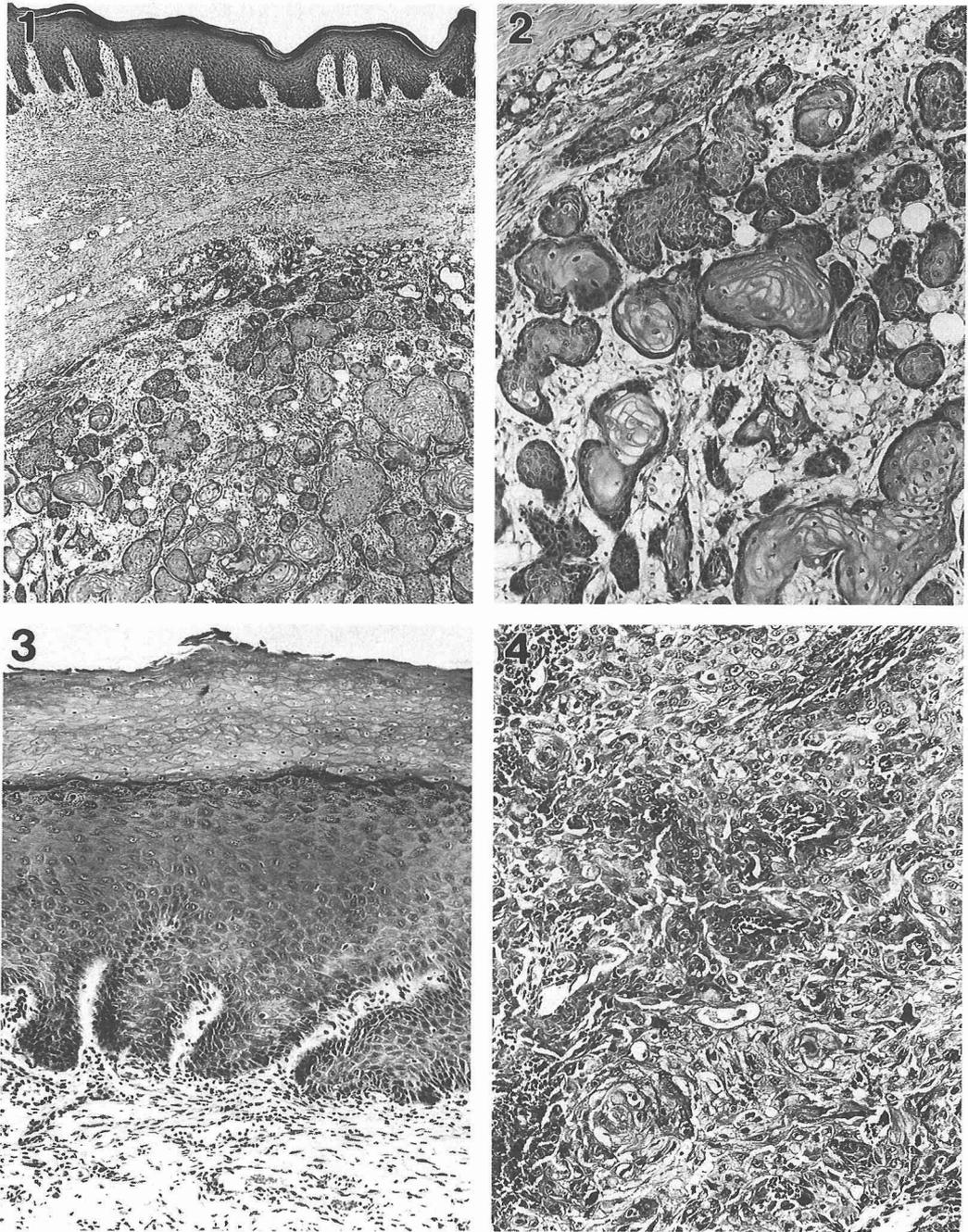


図1～4は、H-E染色標本である。

図1：循環障害と壊死を伴いながらも小葉構造を保っている唾液腺組織（NSM,  $\times 13$ ）。

図2：粘液腺房細胞や導管上皮細胞に著しい扁平上皮化生がみられ、同部には単一細胞角化や癌真珠様の角質形成がある（NSM,  $\times 33$ ）。

図3：有棘層と角質層の肥厚および、顆粒層のケラトヒアリン顆粒の増加がみられる（HYP,  $\times 33$ ）。

図4：異型性の強い上皮性の腫瘍細胞が増殖しているが、癌真珠の形成はない（SCC,  $\times 33$ ）。

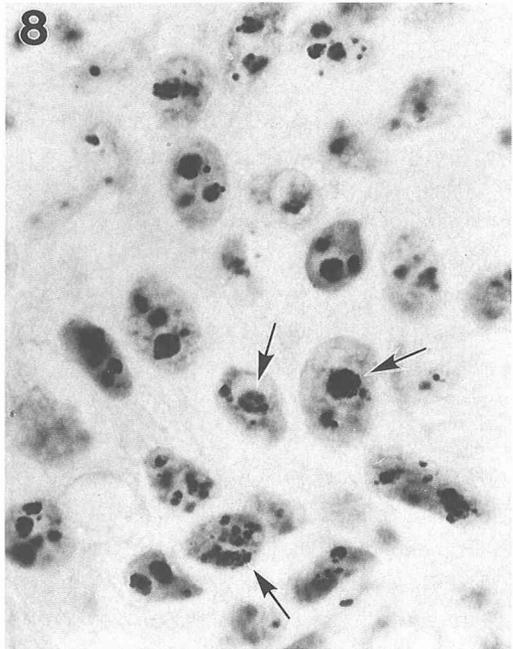
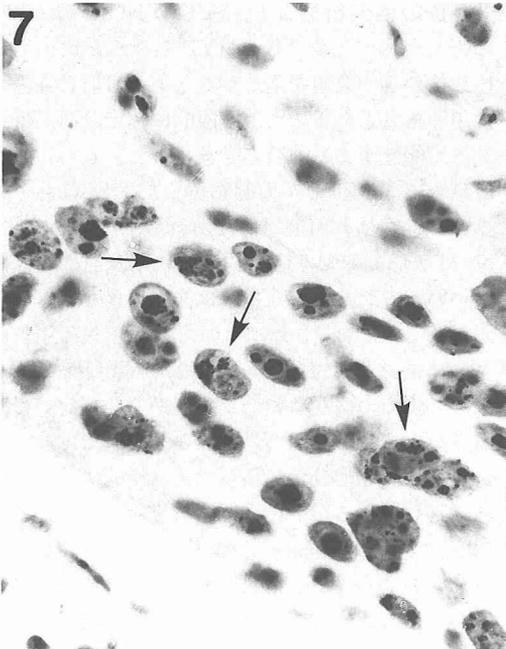
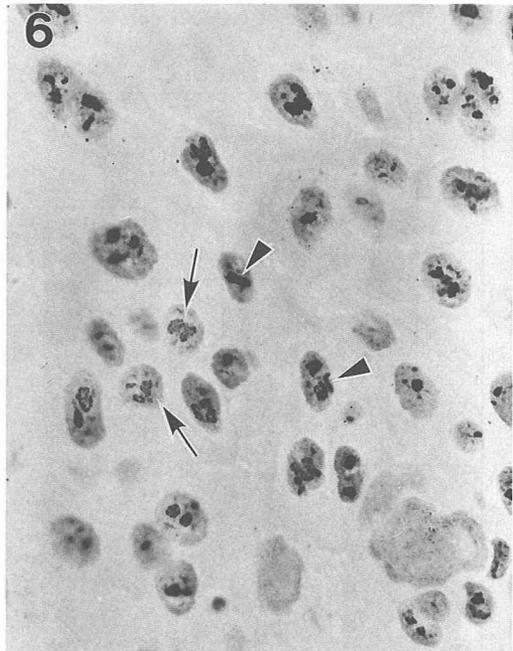
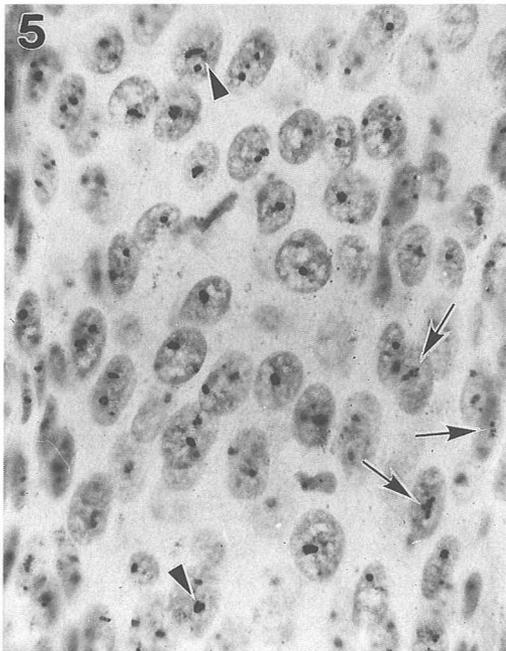


図5～8はAg-NORs染色標本である。

図5：比較的大きさが均一の核内に、NORsはのdots(矢印)として観察されるが、それらの塊状のもの(楔印)も認められる(NSM, ×250)。

図6：類円形や楕円形の核内に、NORsは微細顆粒状のdots(矢印)として観察された。また、楔印で示すように棍棒状や線状の塊状物も多くみられる(HYP, ×250)。

図7：種々の形態の核内に、矢印で示すように微細顆粒状に散在しているNORs(SCC, ×250)。

図8：矢印で示す塊状となったNORsは、大きく、その形態は様々である(SCC, ×400)。

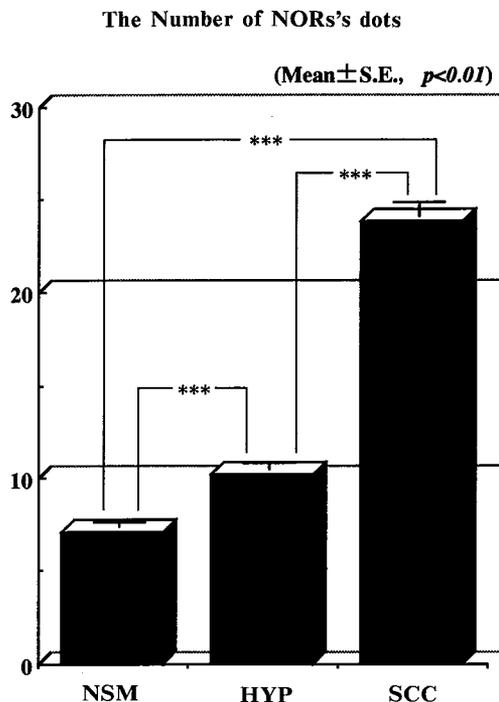


図9：NORs数の比較

未だに複雑な部分も多く、また固定法の問題や細胞の種類等によって高価な抗体を必要とするため、時間的および経済的な面に問題が残る。その点、NORs染色によって得られた染色標本からNORs数を計測することによってNSMのような非腫瘍性病変、HYPのような前癌病変や上皮性異形成のような腫瘍性病変とSCCのような悪性腫瘍の境界領域にある病変を鑑別できれば、時間的ならびに経済的にも非常に有用な方法であろうと考えられる。

腫瘍性病変におけるNORsについては、予後の推定の有力な指標になる可能性も考えられており、Kaneko, et al.<sup>8)</sup>は肺腺癌の患者について検討し、NORsの発現個数の少ない患者の5年生存率はその多い患者と比較して明らかな有意差をもって高いと述べている。一方、阿部<sup>9)</sup>はやはり、肺腺癌の症例について検索し、NORs数の少ない患者の5年生存率はその多い患者に比べて良好であったものの、明らかな有意差は認めていない。

また、NORsを計測する際、その計測の対象物をどのような構造物にするのかについては、研究

者によって異論のあるところである<sup>10-14)</sup>。我々の今回の検索でも、NORsは核内に微細顆粒状にみられたものと、それらが塊状になったものの2種類のものが観察された。これについて多くの研究者は、塊状の構造物を1つのNORsとして計測し、種々の病変におけるNORs数を比較検討しているが、我々は微細顆粒状のdotsをNORsとして計測した。この考えについては前報(武井ら, 1994)に記載した通りであり、生物学的な根拠はないが、我々がこれまでに検索した結果では、塊状構造物をNORsとするのならば、病変によるNORs数にはほとんど差はない。それならば、NORsの数よりはむしろその形態や核内の面積、周長、長径などの二次的指標によって比較すべきであろうと考えられる。これを肯定する所見として、今回の我々の検索結果からもNSM, HYP, SCCと細胞の増殖能が増すにつれ、dotsの集合した塊状構造物の大きさは大きくなる傾向にあった。

今回の検索結果より、SCCのNORsはNSMのそれに比べて約3倍、HYPのそれに比べても約2倍の高い数値を示したことから、H-E染色と併用することによって、客観的に確定診断が得られる可能性があるものと考えられた。しかし、現段階ではNORs数が何個を越えたらSCCといえるのか、同様に何個以内であれば、HYPまたはNSMと診断しても臨床的な症状と本当に相違はないのかという明確な基準は作成できないものと思われる。なお、これについては、PCNA染色による結果でも同様な一面があり、Wintzer et al.<sup>6)</sup>は、乳腺での病変において癌症例と非癌症例の増殖指数を比較した場合、各群の平均値では非癌症例が2.1%、癌症例が14.5%で統計学的に差があると報告しているが、越川<sup>7)</sup>は、そのレンジが非癌症例で0.03%から12.1%、癌症例で0.7%から37.2%であり、増殖指数の低い癌では非癌症例と差がみられないと述べている。また、増殖指数が高い場合には、癌の可能性が高いことは事実であるものの、再生や過形成などの反応性病変でも増殖指数は増加するので、常に鑑別診断の確実な指標になるとは言い難いとしている。したがって癌と非癌を区別するためのものというよりも、むしろ癌と診断された症例において癌の悪性度を評価するために用いる方が現実的であると述べてい

る。我々は今回の検索結果より、NORs数の評価についても同様なことを考えた。

また、繰り返し述べているように、NORs数を計測する際にはその計測対象となる構造物についても報告者により議論の分かれるところであり、もし我々のように微細顆粒状のdotsをNORsとしてとらえ、その数を計測するとしても、前述したような数値的な判断基準はないため、確定診断の決定的な手法とは言えない。このことは、核内のdotsまたは塊状構造物の核内面積率を求めて判断する場合でも同様であり、一定の数値を越えれば悪性腫瘍で、越えなければ良性腫瘍であるという基準は作れないものと考えられる。このような理由から、やはり、阿部の言うように良性または悪性腫瘍の鑑別に用いる指標というよりは、悪性腫瘍の悪性度を評価する指標とする方がより現実的であり、我々の今回の検索においても、NSM、HYP、SCCの順でNORs数は増加したことより、より正常に近い病変でのNORs数は少なく、悪性になるにつれ増加するという範疇にとどまるものであろうと考えられた。

さらに、Sasano, et al.<sup>15)</sup>によると、副腎皮質、甲状腺ならびに下垂体などの内分泌腺腫瘍では良性、悪性腫瘍間においてもNORs数に有意な差は無いという報告もあり、腫瘍の発生母組織の違いによってNORs数の基本的な数が異なる可能性も示唆される。我々が今回検索した材料のうち、NSMと他の2症例では発生母組織がそれぞれ異なるものである。このことから、今後はNORs数を比較するのにも同一発生母組織内での病変についてそのNORs数の相違を検索する必要があるものと思われた。すなわち、まず各正常組織間のNORs数の違いが有るのか無いのかについての比較検討をする必要がある。また、特に、唾液腺などの内分泌系の臓器については、漿液腺、粘液腺、混合腺組織間での違い、または大唾液腺と小唾液腺での違いについても詳細に検索した上で、各種の病変におけるNORs数を比較していきたいと考えている。

## 結 論

我々の報告した改良鍍銀染色法（定着—金置換法）によって増殖期の活発な細胞を有する3種類の病変のNORs数を比較したところ、NSMでは

7.1±0.2、HYPでは10.2±0.3、SCCでは23.8±0.7となり、危険率1%でそれぞれ互いに有意差を認めた。

これらの結果を踏まえて考察を加えたところ、NORs計測は、良性または悪性腫瘍の鑑別に用いる指標というよりは、ただ単に細胞の増殖能を評価する指標にとどまるべきものであると結論された。

なお、本研究の一部は、1993年度松本歯科大学特別研究補助金によって行われた。

## 文 献

- 1) Leek, R. D., Alison, M. R. and Sarraf, C. E. (1991) Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *J. Pathol.* **165**: 43—51.
- 2) Ruschoff, J. and Plate, K. (1989) Nucleolar organizer regions (NORs). Basic concepts and practical application in tumor pathology. *Pathol. Res. Pract.* **85**: 878—885.
- 3) Howell, W. M. and Black, D. A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*, **36**: 1014—1015.
- 4) 武井則之, 安東基善, 長谷川博雅, 川上敏行, 枝重夫 (1994) 核小体形成体のための鍍銀染色法の検討. *松本歯学*, **20**: 172—179.
- 5) Abramus, A. M., Melrose, R. J. and Howell, F. V. (1973) Necrotizing sialometaplasia, A disease simulating malignancy. *Cancer*, **32**: 130—135.
- 6) Wintzer, H. O., Zipfel, I., Schulte-Mönting, J., Hellerich, U. and von Kleist, S. (1991) Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer*, **67**: 421—428.
- 7) 越川 卓, 中村栄男, 鬼頭邦吉, 林香予子, 陶山元一, 國島和夫 (1994) 肺癌とPCNA. *臨床病理*, 特: 113—124.
- 8) Kaneko, S., Ishida, T., Sugio, K., Yokoyama, H. and Sugimachi, K. (1991) Nucleolar organizer regions as prognostic indicator for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **51**: 4008—4011.
- 9) 阿部庄作 (1994) 肺癌とAgNORs. *臨床病理*, 特: 104—112.
- 10) Crocker, J. and Nar, P. (1987) Nucleolar orga-

- nizer regions in lymphomas. *J. Pathol*, **151** : 111—118.
- 11) Hansen, A. B. and Ostergard, B. (1990) Nucleolar organizer regions in hyperplastic and neoplastic tissue. *Virchows Arch. A*, **417** : 9—13.
- 12) 矢谷隆一, 矢花 正, 中野 洋, Ioshii, S. O., 白石泰三 (1993) 前立腺癌, 甲状腺癌と Ag-NORs. *臨床病理*, **94** : 138—145.
- 13) Shiro, T., Seki, T., Naitoh, Y., Inoue, K. and Okamura, A. (1993) A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions with stage of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **71** : 44—49.
- 14) Crocker, J., Boldy, D. A. R. and Egan, M. J. (1989) How should we count Ag-NORs? proposals for a standardized approach. *J. Pathol*. **158** : 185—188.
- 15) Sasano, H., Saito, Y., Sato, I., Sasano, N. and Nagura, H. (1990) Nucleolar organizer regions in human adrenocortical disorders. *Modern Pathology*, **3** : 591—595.