

〔原著〕 松本歯学 20 : 172~179, 1994

key words : 核小体形成体 — 鍍銀染色 — チオ硫酸ナトリウム — 塩化金 — 微小銀粒子

## 核小体形成体のための鍍銀染色法の検討

武井則之, 安東基善, 長谷川博雅,  
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)

### Evaluation of Silver Impregnation Methods for Nucleolar Organizer Regions

NORIYUKI TAKEI, MOTOYOSHI ANTOH, HIROMASA HASEGAWA,  
TOSHIYUKI KAWAKAMI and SHIGEO EDA

*Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental College  
(Chief : Prof. S. Eda)*

#### Summary

The silver impregnation method for nucleolar organizer regions (Ag-NORs) was developed by Howell and Black (1980), and their one-step method is thought to be quiet useful as a marker of proliferation activities of cells. However it had a tendency to cause contamination due to non-specific absorption and precipitation of silver dots on the surface of the specimens. Therefore, the purpose of the present article is to evaluate the best method for the demonstration of Ag-NORs proteins using two materials; one is hyperkeratosis, and the other is squamous cell carcinoma. The original and modified methods used and the staining results are as follows:

The original method was performed according to the Howell and Black method. Ag-NORs staining solution was prepared by dissolving gelatin in 1% aqueous formic acid at a concentration of 2%, this solution was mixed, 1:2 volumes, with 50% aqueous silver nitrate solution (this solution was freshly made at each time, filtered through a 0.02  $\mu\text{m}$  Millipore filter, Millex-GV<sup>®</sup>: JAPAN MILLIPORE, Ltd., Tokyo), to create the final working solution. This was poured over the tissue sections and left for 25 minutes under safetylight conditions. These specimens were washed off for 15 minutes with running water. Counter staining was not used, and they were dehydrated and mounted. Staining results were difficult to discriminate construction like-mass from microscopic silver dots. However this method had a tendency to contaminate much of the surface of the specimens.

The fixing method was used the same Ag-NORs solution as the original one. Tissue sections had the Ag-NORs solution poured upon them and left for 25 minutes under safeligh conditions. After washed off with running water, they were dipped into a 5% sodium thiosulfate pentahydrate solution and left for 5 seconds. Finally they were washed off for 15 minutes with running water, dehydrated and mounted. According to the results, it was considered possible to observe correct Ag-NORs by eliminating excessive absorption and precipitation of silver dots by 5% sodium thiosulfate pentahydrate solution.

The next method, called the substitution method, substituted gold chloride acid tetrahydrate for silver nitrate. Therefore tissue sections had the same Ag-NORs solution poured on them just specimens as the former and were left for 25 minutes. After being washed off with running water, these were dipped into 0.1% gold chloride acid tetrahydrate solution and left for 5 seconds. After wards, these were washed with running water, dehydrated and mounted. These procedures were carried out under safeligh conditions. The results of this method are as follows. Although it is comparatively easy to observe microscopic silver dots, this staining contaminates the surface of many specimens, and this tendency was very similar to the original method.

The fixing-substitution method is as follows ; after fixation the tissue sections had the same Ag-NORs solution poured them as on the former specimens and left for 25 minutes. After washed off with running water, these were dipped for 5 minutes into 5% sodium thiosulfate pentahydrate solution and washed off with running water, and dipped for 5 seconds into 0.1% gold chloride acid tetrahydrate solution. Then, these were washed off for 15 minutes with running water, dehydrated and mounted. We suspected that this method was able to discriminate between microscopic silver dots and construction like-mass. No contaminations were observed on the surface of these specimens. It may be concluded that this method may prove to be better than other three methods.

## 結 言

核小体形成体(Nucleolar Organizer Regions : 以下 NORs と略す)は、その数や大きさ、形態が細胞の代謝、増殖、分化と密接に関連するといわれている<sup>1,2)</sup>。1980年に Howell and Black が考案した1段階鍍銀染色法<sup>3)</sup>(以下 Ag-NORs 法と略す)によって、簡便に NORs の関連蛋白である alglyophilic proteins of the nucleolar organizer regions を染色できるようになって以来、腫瘍の良性・悪性の境界領域の鑑別や分化度の推定を始めとし、その他各種の病変の増殖期にある細胞における精力的な検討が行われている<sup>4,5)</sup>。しかし、Hansen ら(1990)<sup>6)</sup>、矢谷ら(1993)<sup>7)</sup>、および田嶋ら(1993)<sup>8)</sup>が報告しているように、この方法は固定方法、染色時間、染色温度、細胞の種類や病変に出現する細胞の増殖能の違い等の条件によって NORs と考えられる構造物が種々に変化

する欠点をもっている。それは微小な粒子状であったり、それらが3~5個ときにはそれ以上集合して1群のほぼ核小体に近い形態を示したりするので、それを1個の NORs とみるのか3~5個の NORs と判断するのかわからず、その計測方法には混乱がみられ、未だに明確な結論が出ていないのが現状である<sup>6~12)</sup>。さらに、この方法は非特異的な銀粒子の沈着といった人工産物の出現についても問題点が指摘されており、これらの問題点を解決するために原法に対する幾つかの改良染色法も報告されているが<sup>11,12)</sup>、これに対する見解も研究者によって異なり、様々な問題点を残している。そこで今回我々は、前癌病変と悪性腫瘍の各症例を検索材料として Howell and Black の原法<sup>3)</sup>と、その一部を改変した3つの方法による Ag-NORs の染色態度を比較検討し、若干の知見を得たので、その概要を報告する。

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、63歳男性の右側舌下部に発生した過角化症（以下 HYP と略す）（MDC 048-93）と77歳男性の下顎右側小臼歯部相当歯槽堤粘膜に発生した弱角化性扁平上皮癌（以下 SCC と略す）（MDC 079-93②）のそれぞれ1症例で、摘出後、通法により直ちに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

上記の検索材料について厚さ 4 μm のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン重染色（以下 H-E と略す）と以下に示す Howell and Black の原法<sup>3)</sup>、およびそれを一部改変した3種類の Ag-NORs 染色（定着法、金置換法、定着-金置換法）を施して鏡検した。

①原法は Howell and Black の one-step silver colloid 法に準じて行った<sup>3)</sup>。すなわち、0.02 μm のミリポアフィルター（Millex-GV<sup>®</sup>：日本 MILLIPORE, Ltd. Tokyo）で濾過した2%ゼラチン・1%蟻酸水溶液と濾紙（No. 2, Toyo Roshi Kaisya, Ltd. Tokyo）で濾過後、同じミリポアフィルターで濾過した50%硝酸銀水溶液の1：2の割合の混合液をさらに同じミリポアフィルターに通過させた Ag-NORs 液に暗室で25分間反応させた。以後流水で15分間水洗し、通法によりアルコール系列で脱水し、透徹、封入した。

②定着法は、原法と同様の方法で調整した Ag-NORs 液に暗室で25分間反応させた後、流水で1分間水洗し、その後5%チオ硫酸ナトリウム水溶液に5秒浸漬し、余剰な銀粒子を除去し、定着

させた。

③金置換法では同じ Ag-NORs 液に25分間反応させてからやはり流水水洗し、その後、0.1%塩化金に5秒浸漬した。

④定着-金置換法では Ag-NORs 液に25分間反応させた後、5%チオ硫酸ナトリウムにやはり5秒浸漬し、流水で水洗してから0.1%塩化金に5秒浸漬し、金置換した。その後、定着法、金置換法、定着-金置換法で染色したそれぞれの切片を共に流水で15分間水洗後、脱水・透徹し、封入後それぞれの症例の核内の銀粒子の形態や色調、さらには核自体の色調についても油浸レンズ下に肉眼で観察し、比較した。

なお、これら4種の染色方法の比較を表1に示した。

結 果

1. H-E 染色所見

HYP では有棘細胞層がやや肥厚し、釘脚も一部で延長しており、若干の増殖傾向を認めたものの、それらの上皮細胞には異型性は認められなかった（図1）。

また、SCC では固有層内に種々の強い異型性を有する上皮細胞が浸潤増殖し、大小様々な胞巣を形成していた（図2）。

2. Ag-NORs 染色結果

①原法

HYP では、核内に1~3個の棒状または類円形の塊状構造物が認められた（図3 a）。それらに注意深く観察すると、これらの塊状構造物の輪郭には3~10個の円形ときに楕円形の微小な銀粒子が規則正しく配列していた（図3 a 矢印）。また SCC でも HYP とほぼ同様に円形あるいは不整

表1：Ag-NORs 染色の比較

Ag-NORs 染色		原 法	定着法	金置換法	定着-金置換法
染 色 方 法	①脱バラ、水洗	1	1	1	1
	② Ag-NORs 液	25 min.	2	2	2
	③水 洗	1 min.	⋮	3	⋮
	④定 着	5 sec.	⋮	4	⋮
	⑤水 洗	15 min.	⋮	⋮	3
	⑥金置換	5 sec.	⋮	⋮	4
	⑦水 洗	15 min.	3	5	5
	⑧脱水、透徹、封入		4	6	6

※数字は処理の順序を示す。

円形の塊状の構造物として観察されたが、それらの輪郭にみられた微小顆粒状の銀粒子が若干増加しているように思われた(図3 b). また、両症例ともに細胞質内は淡い黄色に、核質はそれよりやや濃い黄色に、塊状構造物は茶褐色に、微小銀粒子はやや濃い茶褐色に染色されて観察された。このため、細胞質と核、核質と塊状構造物の境界の鑑別は容易であったが、塊状構造物と微小銀粒子の境界は判別し難かった。本法による染色標本では染色液中のゼラチンと思われるような細顆粒状の透明な粒子や、硝酸銀の銀粒子と考えられる黒い細顆粒状の粒子がコンタミネーションとして標本上に残存する頻度が高かった。これは検索材料の相違に関係なく、両症例ともに同様であった。

### ②定着法

2種類の構造物の形態と出現様式は、HYP, SCC共に原法で観察された結果とほぼ同様の所見が得られた。すなわち、HYPではほとんどの上皮細胞の核内に1~3個の棒状や不整形または類円形の塊状構造物が認められた(図4 a)。また、10個以上の微小銀粒子が集合して1つの塊状構造物を形成しているものと判断できるような所見も観察された(図4 a, 矢印)。SCCでは核内の大きな構造物は類円形のものより、不規則な棒状のものがやや増加する傾向にあったが(図4 b)、その数は1~2個に減少し、代わりに微小顆粒状の銀粒子が増加していた(図4 b)。なお、塊状構造物内が茶褐色に染色されるのに対し、微小銀粒子の

色調はかなり濃い焦げ茶色に染色されるため、銀粒子は原法による染色結果よりかなり鮮明に観察され、その数や形態についても比較的分別し易くなり、これらが集合したものが一部、棒状または不整形の塊状構造物を形成しているのではないかと考えられるような所見も鮮明に認められた(図4 b)。また、この染色方法では両症例共に組織切片内に原法で出現頻度が高かった透明あるいは黒い小粒子状のコンタミネーションの出現は認められなかった。

### ③金置換法

本法では染色直後では切片が白くなり、一見未染色切片のようにみえたが、およそ24時間後には淡い紫色へと変化した。その時点の切片を鏡検すると、構造物の出現形態やその様式はHYP, SCC共に原法や定着法での結果と同様であった(図5 a, b)。また、色彩についても、核質は薄い紫色に、塊状構造物内はそれよりやや濃い紫色に、また微小銀粒子は黒色に染色されているため、銀粒子と塊状構造物の色彩的鑑別については原法や定着法で観察される結果より、若干ではあるが容易になるように思われたが、顕著な差異は認められず、基本的には原法や定着法での結果とほぼ同様の所見であった(図5 a, b)。さらに、原法での結果とほぼ同様に細胞質と核、核質と塊状構造物の境界の肉眼的鑑別は容易であった。なお、切片中のコンタミネーションと考えられる余剰銀粒子の出現頻度が高いことも原法による染色結果と同様で

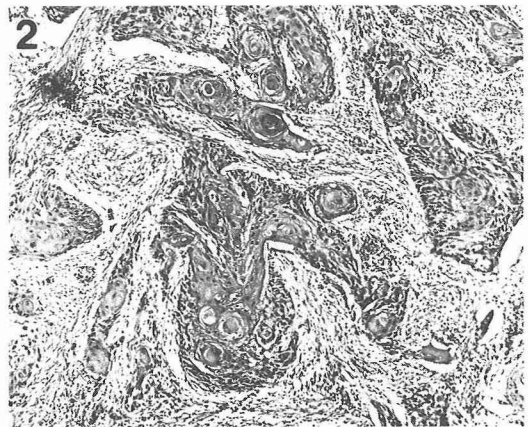
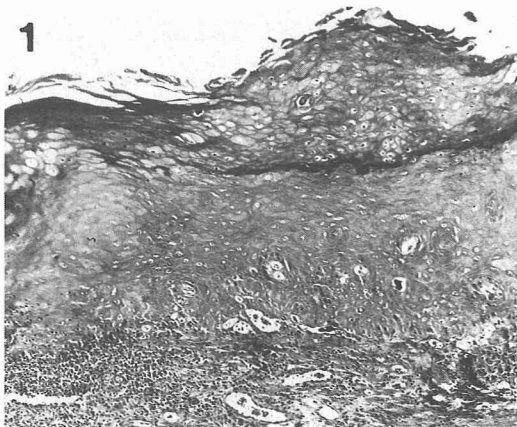


図1：有棘細胞層の肥厚と釘脚の延長を認める過角化扁平上皮(HYP, H-E, ×60)。

図2：強い異型性を有す上皮細胞が浸潤増殖し、大小の胞巣を形成している弱角化扁平上皮癌(SCC, H-E, ×60)。

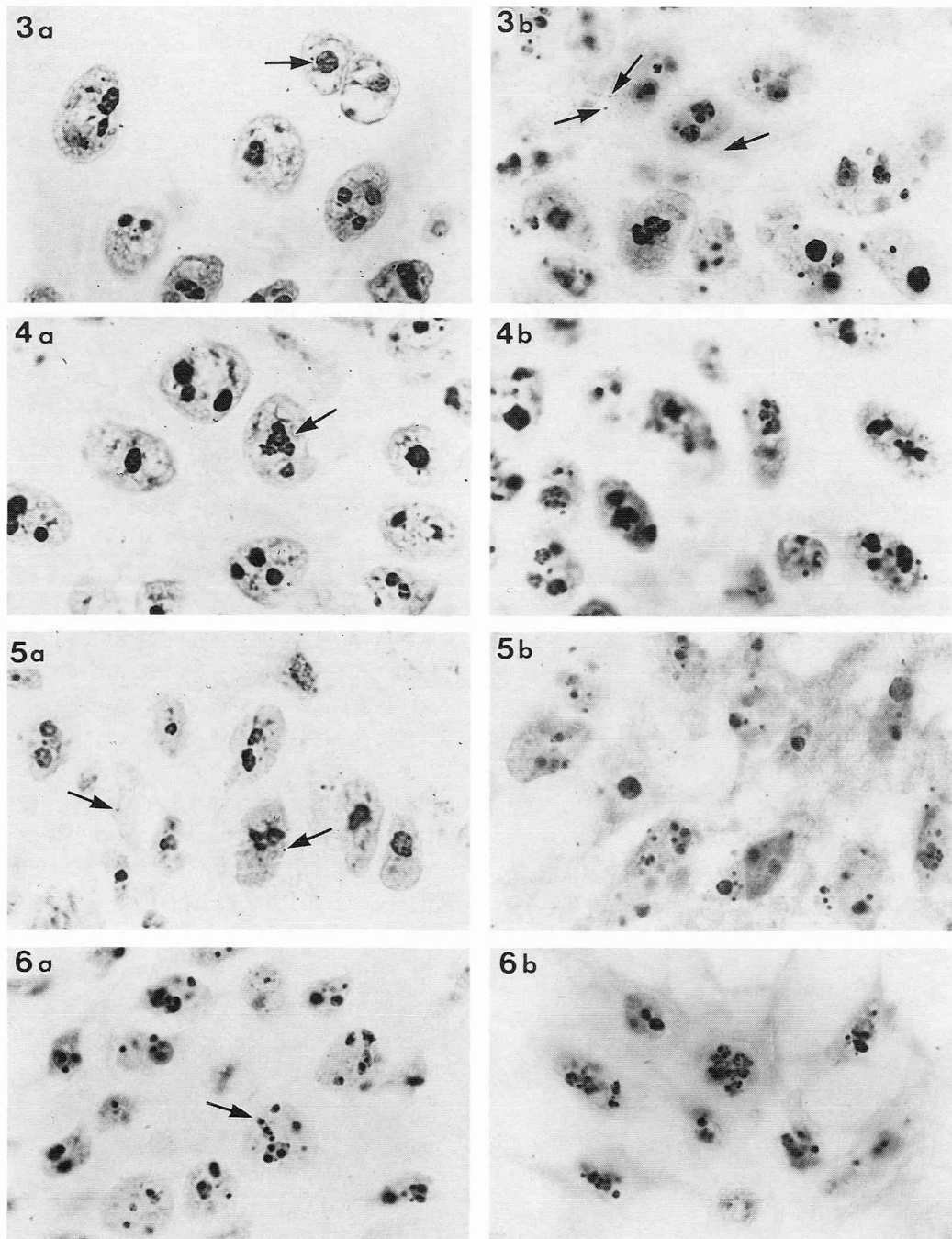


図3 a : 矢印で示す円形の塊状構造物内には5個の微小な小粒子が観察される(HYP, 原法,  $\times 1,200$ ).  
 図3 b : 図3 a とほぼ同様だが, 小さなコンタミネーション(矢印)が目立つ(SCC, 原法,  $\times 1,200$ ).  
 図4 a : 10個以上の小粒子が1つの塊状構造物を形成している(矢印).(HYP, 定着法,  $\times 1,200$ ).  
 図4 b : 単独で核内にある dots も多いが, コンタミネーションは観察されない(SCC, 定着法,  $\times 1,200$ ).  
 図5 a : 図3 a とほぼ同様の塊状構造物. コンタミネーション(矢印)が多い(HYP, 金置換法,  $\times 1,200$ ).  
 図5 b : 微小な dots も多く観察されるが, コンタミネーションとの判別が難しい(SCC, 金置換法,  $\times 1,200$ ).  
 図6 a : 核内(矢印)には13個の dots が存在する. コンタミネーションはない(HYP, 定着-金置換法,  $\times 1,200$ ).  
 図6 b : dots が凝集しているが, その数は判然としない(SCC, 定着-金置換法,  $\times 1,200$ ).

あった。

#### ④定着—金置換法

2つの構造物の病変の違いによる形態や出現形式はこれまでの結果と同様であった。また、色彩については金置換法での結果と同様に微細銀粒子は黒色に核質は薄い紫色に塊状構造物はやや濃い紫色に染色されて観察された(図6 a, b)。なお、コンタミネーションの出現はなく、これは定着法による染色結果と同じであった。

### 考 察

冒頭で述べたように、Ag-NORsの染色には、Howell and Blackが考案した原法の他に、その一部を改変した幾つかの方法の報告がある<sup>11,12)</sup>。今回我々は、原法でAg-NORs液に30分間浸漬させているのに対して、25分で実施した。これは余剰な銀粒子の沈着を出来る限り減少させるためである。これについて我々は、15分から60分間の間隔で染色時間のある程度変えて実施してみたが、30分を越えると銀粒子が塊となって観察されるものが非常に多くなり、種々の報告にあるような形態を示すNORs<sup>4,7,8,9,12)</sup>がほとんどなかった。また、染色時間を25分に短縮しても30分でのものと同様に観察される傾向があったので、25分位とした。染色時間について笹野ら(1991)<sup>11)</sup>は反応開始後、10分でNORsは可視化され始めて、15~30分間の反応時間で最も計測がしやすくなり、30分を過ぎると核小体そのものが黒く染色されて観察が困難となるため、Ag-NORs溶液の反応は20~30分間が適当であり、最も良好な結果が得られるとの見解を示している。なお、Ag-NORs染色液の温度についても20℃とするものや37℃とするもの、室温とするもの等の報告があるが<sup>9)</sup>、今回我々は全て室温で実施した。なお、我々は染色温度の差異による染色態度の相違も経験している。したがって、我々の用いた染色液に温度差があることは事実であり、それによって染色態度にも若干の変化があることは否めないが、これについて今回は触れない。また、寺田ら(1994)<sup>10)</sup>の報告による本法での5%チオ硫酸ナトリウム水溶液への浸漬時間は5分間となっているのに対し、我々が5秒間で行ったのは、5分間ではAg-NORs溶液で黄褐色に染色された切片の色彩が消失し、未染色切片のようになってしま

う傾向が多いためであり、2つの症例において時間の差をつけて浸漬時間を検討したところ、およそ5秒間位が適当だと思われたためである。これについての化学的裏付けは皆無であり、これから検討しなければならない課題の一つである。さて、今回の検索結果より、Ag-NORsと考えられる銀粒子の形態は大きく2つに分けられた。そのひとつは微小顆粒状として観察されるもので、染色法の違いによる差異はないものの、HYPよりSCCにおいて塊状のものから分離し、単独で散在するものが多かった。また、前述した定着法および定着—金置換法のように定着操作を施した染色法の方が、原法単独での染色や金置換法による染色よりも比較的鮮明に観察された。もう一方は、円形または不整な棒状の形態に観察される塊状のものであり、これも、どの染色法による結果であっても同様に観察されたが、これは、SCCよりHYPでやや多くみられた。また、この一部の塊状構造物には、先の微小銀粒子の集合体ではないかと思われるようなものも観察された。さらに、それぞれの構造物の色彩的鑑別については、原法による染色結果で塊状構造物と核質、塊状構造物と微小銀粒子の両者共に困難であったのに対し、定着法では塊状構造物と核質についてはそれほど著明ではないものの塊状構造物と微小銀粒子についてはかなり判別し易くなった。金置換法による染色でのそれぞれの構造物は、定着法での結果とほぼ同様に、塊状構造物と微小銀粒子との鑑別が原法での染色より若干ではあるが容易になるように思われた。なお、核質と塊状構造物の分別については鮮明ではないが、やや分別し易いように観察された。定着—金置換法では定着法で得られた所見にわずかに核質を紫色に着色したといった結果であり、核質と塊状構造物、塊状構造物と微小銀粒子は比較的分別しやすかった。

Ag-NORsの形態と分布については様々な報告があるが、まず、CrockerとNar(1987)<sup>4)</sup>は手技を慎重に行うことに加え、核小体内に出現する好銀性構造物の解析が重要であると述べている。彼らは核小体内の集塊状のものを一つのAg-NORsとして数え、それに核小体外の粒子を加算することを薦めている。これに対し、HansenとOstergard(1990)<sup>9)</sup>は前立腺組織に発生した肥大症(BPH)、異型過形成(PIN)と前立腺癌(PC)に

ついてそれぞれの Ag-NORs 数とその形態を検討している。それによると、BHP では PIN, PC に比べ、Ag-NORs 数が少なく、微細顆粒状の Ag-NORs が多く観察され、顆粒状の Ag-NORs を伴った中型ないし大型の核小体は PIN と PC のみに認められたとし、Ag-NORs 数自体は良性および悪性病変で重なりが多かったという結果から、粒子数の計測よりはむしろ形態が良性悪性の鑑別になると結論し、形態分類を提唱している。また矢谷ら (1993)<sup>7)</sup>は、前立腺肥大症と中および低分化型腺癌における Ag-NORs 染色の結果から核小体内の粒子を総て計測した方が、良性・悪性の差をより明かにすることができる可能性が示されたものの、観察条件を厳密にすることや出現パターンなどを加味して総合的に検討すべきであるとの見解を示している。さらに Shiro ら (1993)<sup>9)</sup>は Ag-NORs の形態を 2 型に分類し、1 型は核小体に一致した境界明瞭な大型ないし中型の粒子で茶褐色を呈するが、2 型は境界不明瞭な微細顆粒状の黒色粒子で 1 型の周辺に散在し、時に集塊を形成するとしている。また、Ag-NORs の細胞生物学的意義については言及していないものの、2 型の Ag-NORs の増加と小型の黒色粒子を伴った 1 型 Ag-NORs の出現は悪性例に多いとし、一般に悪性腫瘍における細胞で Ag-NORs が増加するのは主に 2 型 Ag-NORs が増加するためではないかと考え、形態観察の重要性を指摘している。今回の我々の実験結果においても、Ag-NORs と考えられる構造物は形態的には 2 つのタイプに分類された。このことは Crocker と Nar (1987)<sup>4)</sup>、Hansen と Ostergard (1990)<sup>6)</sup>、矢谷ら (1993)<sup>7)</sup>、そして Shiro (1993)<sup>9)</sup>らの検索結果と一致していた。問題は両構造物のどちらを Ag-NORs としてとらえ、観察・計測すれば、より真の Ag-NORs に近い Ag-NORs を計測でき、生物学的な指標を得られるかということにある。Ag-NORs が微細顆粒状に観察される理由として寺田と中沼 (1994)<sup>10)</sup>は以下のように述べている。すなわち、Ag-NORs はヒトでは 13, 14, 15, 21, 22 番目の計 5 種の相同染色体の短腕に位置し、正常細胞は 2 本の染色体を有するので、G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>期では計 10 個、S 期では 10-20 個、G<sub>2</sub>期では 20 個の Ag-NORs が存在するはずであるが、実際には間期細胞では NORs は小さな核小体にバックされて

いるために光顕的には同定が困難であるとしている。また、矢谷と矢花 (1993)<sup>7)</sup>は (1)細胞増殖能が活発だと核小体の末葉集が起り、個々の Ag-NORs が判別出来るようになる。(2)細胞の ploidy が増加し、NORs を持つ染色体が増加した (3)転写活性の増加により不明瞭であった NORs が明瞭化したのではないかという 3 つの仮説を立てている。我々の今回の検索では何が真の Ag-NORs なのかという問題については言及しない。しかし、今回の検索において一部観察されたような塊状構造物は全てが微小銀粒子の集合体であると仮定すれば、これまで多くの研究者が計測してきた NORs 数というものは極めて曖昧な指標となる。むしろ、核内占有面積率の方が細胞の増殖能を反映するのではないかと考えられる。ただ、2 つのパターンに観察されたどちらの構造物をどのように計測していくにしろ、より正確な数値を得るためには限界はあるものの、今回我々が検討した定着法で核内に沈着した余剰な銀粒子を一度、5%チオ硫酸ナトリウム溶液中に浸漬させ、除去することによって、計測の対象が数であれ、形態であれ、面積であれ、より正確な数値を得られるものと考えられた。これはコンタミネーションがなくなるという点からも肯首された。また、微小な銀粒子は、定着後に 0.1%塩化金で金置換をすることによって判別しやすくなったことより、画像解析装置の応用による数や面積等の定量の際にはかなり有効になるものと思われた。

今後は、Ag-NORs 染色結果と共に、やはり腫瘍細胞の増殖能を簡便に知ることが可能な免疫染色の代表として PCNA (増殖期細胞核抗原) 染色を行い、その結果との関連などについても詳細に検索していく予定である。

## 結 論

核小体形成体は細胞の増殖能の指標となり、これの好銀性を利用して一段階の簡便な鍍銀染色法 (Ag-NORs 染色) が、広く応用されている。しかし、これには種々の問題点が指摘されている。そこでこの原法およびそれを一部改変した 3 通り、合計 4 通りの Ag-NORs 染色を行い、Ag-NORs の出現形態について比較検討したところ、以下の結論を得た。

1. Howell and Black の報告にしたがった原法

では、Ag-NORs 液に暗室で25分間反応させた。これによって観察された塊状を示す構造物と微小銀粒子の2種類の構造物の判別は困難であった。また、本法では標本上のコンタミネーションの出現頻度も高かった。

2. 定着法ではAg-NORs 液に25分反応させた後、15分間の水洗を経てから、5%チオ硫酸ナトリウムに5秒間浸漬し、余剰な銀粒子を除去したが、これによってコンタミネーションの出現はなくなり、原法より正確なAg-NORs の計測が可能であると考えられた。

3. 金置換法は、Ag-NORs 液に同様の条件で反応させ、水洗後、0.1%塩化金水溶液に5秒間浸漬した。これによって微小銀粒子はやや観察しやすくなったが、コンタミネーションの出現が多く、原法と類似した所見が得られた。

4. 定着-金置換法は、25分のAg-NORs 液での反応の後、15分間水洗し、その後5%チオ硫酸ナトリウムに5秒間浸漬し、水洗し、次に0.1%塩化金で金置換した。この方法によると定着法と同様にコンタミネーションの出現はなく、また、塊状構造物と微小銀粒子の分別が容易になったことから、微小銀粒子を計測対象物とする際にはより有効な方法になるのではないかと思われた。

#### 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) Ruschhoff, J. and Plate, K. (1989) Nucleolar

organizer regions (NORs). Basic concepts and practical application in tumor pathology. *Pathol. Res. Pract.* **185**: 878-885.  
 3) Howell, W. M. and Black, D. A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*, **36**: 1014-1015.  
 4) Crocker, J. and Nar, P. (1987) Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* **151**: 111-118.  
 5) Howat, A. J., Giri, D. D., Cotton, D. W. K. and Slater, D. N. (1989) Nucleolar organizer regions in Spitz nevi and malignant melanoma. *Cancer*, **63**: 474-478.  
 6) Hansen, A. B. and Ostergard, B. (1990) Nucleolar organizer regions in hyperplastic and neoplastic tissue. *Virchows Arch. A.* **417**: 9-13.  
 7) 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.  
 8) 田嶋基男, 中松生行, 大原 毅, 倉本 秋. (1993) 胃癌とAg-NORs. *臨床病理*, **94**: 125-137.  
 9) 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.  
 10) 寺田忠史, 中沼安二. (1994) 好銀性核小体形成体領域 (Ag-NORs) と腫瘍化. *生体の科学*, **45**: 244-246.  
 11) 笹野公伸, 宮崎修吉, 伊達文字, 佐藤郁郎. (1991) Ag-NORs. -病理組織診断への応用-. *病理と臨床*, **9**: 890-893.  
 12) 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.