歯肉病変における細胞核 DNA 量の研究 ——特に歯肉癌とその境界病変について——

金子 忠 良

A study on nuclear DNA content in gingival lesions ——Especially gingival cancer and its bordering pathological findings——

Tadayoshi KANEKO

Abstract: Nuclear DNA content was determined in 85 subjects made up of 29 patients with carcinoma of the gingiva, 26 with bordering pathological findings (23 with leukoplakia and 3 with epithelial dysplasia), 20 with non-cancerous epithelial hyperplasia (10 with epithelial hyperplasia and 10 with papilloma) and 10 subjects with normal gingival mucosa, and then compared with the histological findings to clarify relationships to cell maturation and tissue differentiation. Measurement of nuclear DNA content was performed by cytofluorometry for cells of the outer and inner layers of cancer nest in carcinomas and for cells of the basal and prickle layers of the epithelium in the other lesions. The results were as follows:

In 56 subjects exclusive of patients with carcinoma, nuclear DNA content was higher in the basal layer than in the prickle layer. Particularly in normal gingivae, histograms showed a single peak with mode at 2C for the basal layer and under 2C for the prickle layer.

The distribution of DNA content was limited within 4C. In non-cancerous epithelial hyperplasias, nuclear DNA content, particularly that of the basal layer, increased as compared with normal mucosa, and increased in papilloma but not in epithelial hyperplasia.

In borderline lesions, nuclear DNA content slightly increased in Grade I and Grade II leukoplakias compared with normal mucosa, while it markedly increased at the basal layer in Grade III leukoplakia featuring cellular atypia and at both the basal and prickle layers in epithelial dysplasia, with the pattern of change sometimes resembling that in carcinoma. In carcinomas in situ, no appreciable variation dependent on the site of measurement was observed in the histogram pattern.

In squamous cell carcinomas, nuclear DNA content was generally high but sometimes close to that in normal mucosa, and the histogram pattern showed a tendency towards diversification. Analysis of relationship between the degree of differentiation and the nuclear DNA content in squamous cell carcinoma disclosed that nuclear DNA was higher in the outer layer of cancer nest than in its inner layer in just over 82% of well-differentiated or moderately-differentiated carcinomas. As carcinoma became less and less differentiated, the modal peak in histograms, particularly those for the outer layer of cancer nest, shifted further to the right and a more flattened pattern resulted while hyperploidy cells occurred with increased frequency, particularly in moderately-differentiated carcinomas.

Key words: bordering pathological findings, cytofluorometry, hyperploidy cells

東京医科大学口腔外科学教室
(主任: 内田安信教授)
Department of Oral Surgery, Tokyo Medical Col-

lege (Chief: Prof. Yasunobu Uchida)
受付日: 昭和60年3月25日

緒 言

今日、癌対策の眼目とされているところは早期発見、早期治療であり、口腔は解剖学的に早期発見の可能性が高い領域といえるが、形態的にも、また機能上からも外来性因子の影響を受けやすく、さらに環境的な特殊性を有するがために病態は複雑、多様であり、その病変の正確な把握は必ずしも容易とはいえない。

それゆえに口腔領域の悪性腫瘍の治療効果の向上を期

するためには、その適確な診断が基本的な要件であることは論を俟たず、したがって同領域の病変の精細な生物学的性状の検討が必要とされる由縁である。

一方、Deoxyribonucleic acid (以下 DNA と記す) は細胞核内において染色体を構成し遺伝子の担体であること、そして癌細胞の核 DNA 量には変化がみられることはすでに広く知られているところであるが、近年、さらに核 DNA 量の変動と前癌性病変の悪性化への病態変化との関連を解明せんとする試みがなされつつあり、注目されている。

本研究は口腔外科領域において、悪性腫瘍の発生頻度が高いとされている歯肉について、癌腫およびその境界病変を中心に種々な状態の細胞核 DNA 量を測定し、組織像と対比して細胞の成熟度ならびに組織分化度との関係を検討することにより口腔外科領域における癌腫を始めとする種々なる病変の診断、治療の上での細胞核 DNA 量測定の臨床応用について考究せんとしたものである。

第 1 章 研究材料および研究方法

第 1 節 研究材料

本研究においては、本学口腔外科教室にて切除ないし採取された歯肉原発病変のうち、癌腫29例、境界病変として白板症23例、上皮異形成症 3 例の計26例、非癌上皮増殖性病変として上皮過形成症、乳頭腫、おのおの10例ずつ計20例、非担癌患者の正常歯肉粘膜10例の計85例を対象として観察した。なお、癌腫については全症例とも抗癌剤投与、放射線治療の既往をもたないものを選択した。

表 1 研究材料の分類

1) 正常歯肉粘膜	10例
2) 非癌上皮増殖性病変群	
(1) 上皮過形成症	10例
(2) 乳頭腫	10例
3) 境界病変群	
(1) 白板症*	
④ 第 I 度	5例
④ 第 II 度	14例
④ 第 III 度	4例
(2) 上皮異形成症	3例
4) 癌 腫	
(1) 上皮内癌	3例
(2) 扁平上皮癌**	
④ 高分化型	13例
④ 中分化型	11例
④ 低分化型	2例

* Shklar の分類¹⁶⁾参照 ** WHO 分類¹³⁾参照

表 2 正常歯肉粘膜の細胞核 DNA 量

症例 No.	年齢	性	基 底 層							有 棘 層						
			mean (C)	vari- ance	histogram				細胞 測定数	mean (C)	vari- ance	histogram				細胞 測定数
					Mo	2C域 (%)	3C域 (%)	OV 4C (%)				Mo	2C域 (%)	3C域 (%)	OV 4C (%)	
N-1	62	♀	1.93	0.07	2C	97.2	2.8	0	109	1.75	0.03	2C↓	100.0	0	0	107
N-2	63	♂	2.00	0.15	2C↓	87.3	12.7	0	71	1.75	0.04	2C↓	97.0	0	0	100
N-3	44	♀	2.05	0.12	2C↓	87.7	12.3	0	106	1.69	0.06	2C↓	79.0	0	0	100
N-4	42	♂	2.17	0.16	2C↑	77.0	21.0	0	100	1.87	0.10	2C↓	83.0	6.0	0	100
N-5	35	♂	2.03	0.14	2C	92.0	8.0	0	100	1.96	0.06	2C	98.0	2.0	0	100
N-6	28	♀	2.03	0.13	2C↓	90.7	9.3	0	108	1.86	0.08	2C↓	93.0	2.0	0	100
N-7	34	♂	2.06	0.15	2C	80.0	16.0	0	100	1.72	0.09	2C↓	77.0	0	0	100
N-8	50	♂	1.90	0.11	2C	88.0	1.0	0	100	1.70	0.07	2C↓	78.0	0	0	100
N-9	63	♂	1.98	0.12	2C	86.0	4.0	0	100	1.87	0.06	2C↓	98.1	1.9	0	104
N-10	50	♂	1.83	0.09	2C	81.0	4.0	0	100	1.78	0.08	2C↓	84.0	0	0	100

↑ : hyper ploidy, ↓ : hypo ploidy, Mo : mode, OV 4C : over 4C

図 1 正常歯肉粘膜上皮の核 DNA 量 histogram

図 2 上皮過形成症の核 DNA 量 histogram

第 2 節 研究方法

前述の研究材料において細胞ならびに組織像について光顕的に観察、分類を行うとともに細胞核 DNA 量を測定した。

1) 材料作製

採取された組織片を 10%ホルマリンで固定後、通法に従いパラフィン包埋ブロックとした。核 DNA 量測定用には 12 μ の厚さに薄切して Feulgen 染色を施行した。また光顕的観察用には隣接する組織を 3 μ の厚さに薄切して Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色および必要に応じて Periodicacid-Schiff (PAS) 染色、Alcian blue 染色を施行した。

なお、Feulgen 染色は藤田の方法¹⁾に準じて同一条件下で厳密に行った。すなわち、組織切片を脱パラフィン、水洗後、1 N HCl 60 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C にて 10 分間加水分解、0.1 N HCl 7 $^{\circ}$ C で反応を停止させ、緩衝 Schiff 液で 7 $^{\circ}$ C 10 分間染色、15% NaHSO₃ 加グリシン緩衝液で 7 $^{\circ}$ C 2 分間ずつ 3 回洗浄、水洗、脱水後、Entellan (Merk) で封入した。Schiff 試薬には pararosaniline を蛍光色素として使用した。

2) 測定方法

本研究では細胞核 DNA 量の測定は蛍光測光法によって行い、装置としてオリンパス光学社製落射型顕微蛍光

測光装置 (OLYMPUS BH-2 QRFL SYSTEM) を使用した。すなわち、測光には蛍光用対物 100 倍レンズ、545 nm の緑色励起で 630 nm の測光用フィルターを使用した。なお、測定に先だって細胞核の back ground から発生する非特異蛍光を除去するためにあらかじめ Feulgen 染色標本を緑色励起光にて十分な post-irradiation を施行した。

3) 細胞核 DNA 量の検討

核 DNA 量の測定は、正常歯肉粘膜、非癌上皮増殖性病変および境界病変では基底層ならびに有棘層の両部位について、また癌腫では基底層に対応する癌巣の外層部数層 (以下、外層と略す) と有棘層に対応する癌巣の内部 (以下、内層と略す) について測定した。

測定細胞数は原則として各測定部位でのおおの 100~200 個とし、一標本あたり 200~400 個の細胞核 DNA 量を測定した。

核 DNA 量については、同一標本中の小リンパ球 30 個の平均値を 2 倍体値 (以下、2 C と略す) と想定し、これを基準とした。

測定値については、症例ごとに核 DNA 量の単純算術平均値 (以下、mean と記す)、分散値 (以下、variance と記す) を算出し、さらに測定値の分布状態を表す histogram を作製し、その最頻値 (以下、mode と記す)

表 3 非癌上皮増殖性病変の細胞核 DNA 量

症例 No.	年齢	性	組織診断名	基 底 層				有 棘 層							
				mean (C)	variance	histogram			mean (C)	variance	histogram				
						Mo	2C域 (%)	3C域 (%)			OV 4C(%)	Mo	2C域 (%)	3C域 (%)	OV 4C(%)
E-1	65	♂	上皮過形成症	2.21	0.40	2C	68.0	19.0	0	100	1.80	80.0	3.0	0	100
E-2	74	♂	上皮過形成症	1.93	0.13	2C↓	86.0	7.0	0	100	1.65	70.0	0	0	100
E-3	54	♀	上皮過形成症	2.07	0.12	2C	89.0	11.0	0	100	1.97	100.0	0	0	100
E-4	54	♂	上皮過形成症	1.95	0.21	2C↓	73.0	11.0	0	100	1.70	54.0	6.0	0	100
E-5	49	♂	上皮過形成症	2.17	0.17	2C↑	72.0	21.0	0	100	1.94	95.0	0	0	100
E-6	74	♀	上皮過形成症	1.72	0.18	2C↓	58.0	6.0	0	100	1.58	52.0	2.0	0	100
E-7	44	♀	上皮過形成症	2.02	0.16	2C↓	86.0	14.0	0	100	1.97	95.0	5.0	0	100
E-8	34	♂	上皮過形成症	2.38	0.23	2C↑	65.4	30.8	0	107	1.87	89.0	3.0	0	100
E-9	45	♀	上皮過形成症	2.22	0.23	2C↑	76.4	20.9	0	110	1.89	98.0	2.0	0	100
E-10	63	♂	上皮過形成症	2.28	0.20	2C↑	73.0	22.0	0	100	1.85	76.0	7.0	0	100
P-1	63	♂	乳 頭 腫	2.12	0.34	2C↑	64.0	19.0	0	100	1.87	73.0	9.0	0	100
P-2	59	♂	乳 頭 腫	2.57	0.35	2C↑	49.0	42.0	2	100	1.95	83.0	7.0	0	100
P-3	50	♂	乳 頭 腫	1.95	0.09	2C	91.0	4.0	0	100	1.85	100.0	0	0	100
P-4	40	♀	乳 頭 腫	2.34	0.24	2C↑	66.0	30.1	0	103	2.06	100.0	0	0	100
P-5	72	♀	乳 頭 腫	2.23	0.41	2C	59.0	24.0	0	100	1.97	97.1	2.9	0	104
P-6	59	♀	乳 頭 腫	2.60	0.41	3C↓	45.4	46.3	2.8	108	2.02	93.0	7.0	0	100
P-7	36	♂	乳 頭 腫	2.29	0.30	2C	71.8	23.3	1.9	103	2.02	100.0	0	0	104
P-8	42	♀	乳 頭 腫	2.19	0.39	2C↓	61.0	23.0	0	100	1.77	84.0	1.0	0	100
P-9	45	♂	乳 頭 腫	2.34	0.23	2C↑	67.9	28.3	0	106	2.02	96.1	3.9	0	102
P-10	74	♀	乳 頭 腫	2.30	0.24	2C	74.5	21.7	0	106	1.94	97.0	3.0	0	101

写真 1 上皮過形成症 (H-E 染色, 中拡大)

写真 2 上皮過形成症 (Feulgen 染色, 中拡大)

と, 2 倍体値領域 (以下, 2 C 域と略す), 3 倍体値領域 (以下 3 C 域と略す), 4 倍体値を越える領域 (以下, over 4 C と略す) に分布する細胞数の割合を算出し個々の病変群傾向の比較検討を行った。

第 2 章 研 究 成 績

細胞, 組織形態および組織分化度の程度を中心とする光顕的観察所見を基盤として研究材料を表 1 のごとくに

写真 3 乳頭腫 (H-E 染色, 弱拡大)

写真 4 乳頭腫 (Feulgen 染色, 中拡大)

分類し, それに基づいて被覆上皮ないし上皮性細胞における細胞核 DNA 量の測定を行った。検索された個々の症例の成績は表のとおりであるが, 以下各群ごとに集積された成績について述べる。

1) 正常歯肉粒膜

正常歯肉粘膜上皮 10 例の成績は表 2 のとおりである。

基底層での核 DNA 量の mean は 1.83~2.17C の範囲で平均 2.00C, variance は 0.07~0.16 の範囲で平均 0.12 であった。histogram の分布状態は高 1 C から高 3 C までの分布を示し (図 1-1), 全症例単峰性で mode は低 2 C から高 2 C の範囲にあり総合的には 2 C で全症例が 2 C 域にあった。2 C 域および 3 C 域への細胞の収束率は, それぞれ 77.0~97.2%, 平均 86.7%, 1.0~21.0%, 平均 9.1% であった。また over 4 C の高倍体細胞の出現は 1 例もみられなかった。

有棘層での核 DNA 量の mean は 1.69~1.96C の範囲で平均 1.80C, variance は 0.03~0.10 の範囲で平均

表 4 境界病変の細胞核 DNA 量

症例 No.	年齢	性	組織診断名	基 底 層				有 棘 層									
				mean (C)	variance	histogram			mean (C)	variance	histogram						
						Mo	2C域 (%)	3C域 (%)			OV 4C(%)	Mo	2C域 (%)	3C域 (%)	OV 4C(%)		
L-1	49	♂	白板症第Ⅰ度	2.22	0.32	2C↓	75.2	19.8	0	101	1.89	0.06	2C	96.0	2.0	0	100
L-2	46	♂	白板症第Ⅰ度	2.31	0.34	2C	68.7	24.0	0	150	1.92	0.09	2C↓	96.6	3.4	0	116
L-3	60	♂	白板症第Ⅰ度	2.38	0.45	2C↑	67.0	24.3	3.9	103	2.00	0.11	2C	93.3	6.7	0	105
L-4	58	♂	白板症第Ⅰ度	2.93	0.75	3C↑	33.3	45.9	12.6	135	2.10	0.10	2C	90.0	10.0	0	150
L-5	70	♀	白板症第Ⅰ度	2.13	0.09	2C	88.9	11.1	0	108	1.88	0.06	2C↓	97.0	3.0	0	101
L-6	35	♂	白板症第Ⅱ度	2.74	0.44	3C↑	35.2	48.6	2.8	105	1.97	0.08	2C	95.2	4.8	0	105
L-7	57	♀	白板症第Ⅱ度	2.12	0.19	2C	81.5	18.5	0	151	1.82	0.04	2C↓	100.0	0	0	126
L-8	42	♀	白板症第Ⅱ度	3.65	0.52	4C↑	7.4	30.6	22.3	121	2.17	0.11	2C↓	86.5	13.5	0	148
L-9	68	♀	白板症第Ⅱ度	2.04	0.15	2C↑	84.0	13.0	0	100	1.85	0.17	2C↓	86.0	7.0	0	100
L-10	63	♂	白板症第Ⅱ度	2.08	0.29	2C	78.2	10.9	0	110	1.84	0.05	2C↓	98.0	0	0	100
L-11	78	♂	白板症第Ⅱ度	2.29	0.32	2C	71.3	22.8	0	136	2.07	0.42	2C↓	82.0	12.0	0	100
L-12	51	♀	白板症第Ⅱ度	2.14	0.13	2C	82.4	17.6	0	199	2.07	0.13	2C	90.1	9.9	0	182
L-13	37	♂	白板症第Ⅱ度	2.07	0.16	2C↓	83.6	16.4	0	146	1.88	0.05	2C↓	100.0	0	0	167
L-14	68	♂	白板症第Ⅱ度	1.97	0.18	2C↑	81.8	12.6	0	159	1.92	0.07	2C↓	98.8	1.2	0	164
L-15	65	♂	白板症第Ⅱ度	2.39	0.37	2C↑	63.9	27.9	1.4	147	1.92	0.11	2C↓	96.0	4.0	0	175
L-16	62	♀	白板症第Ⅱ度	2.08	0.15	2C↓ 2C	88.3	11.7	0	103	1.74	0.04	2C↓	100.0	0	0	100
L-17	56	♂	白板症第Ⅱ度	2.13	0.34	2C↓	78.6	18.8	0	117	2.13	0.27	2C	85.4	9.5	0	137
L-18	50	♀	白板症第Ⅱ度	2.54	0.43	2C↑	56.3	34.5	3.5	142	2.12	0.17	2C	82.1	17.9	0	140
L-19	76	♂	白板症第Ⅱ度	2.38	0.84	2C↑	73.8	14.2	6.4	141	2.07	0.14	2C	89.1	10.9	0	147
L-20	63	♂	白板症第Ⅲ度	3.30	0.48	4C↑	15.5	42.3	11.3	71	1.98	0.07	2C	97.2	2.8	0	145
L-21	61	♀	白板症第Ⅲ度	2.50	0.49	2C↑ 3C↓	54.0	34.0	4.0	100	2.04	0.18	2C↑	75.0	14.0	0	100
L-22	57	♀	白板症第Ⅲ度	2.21	0.27	2C↑	72.0	20.0	0	100	2.00	0.12	2C	80.0	7.0	0	100
L-23	65	♀	白板症第Ⅲ度	2.51	0.82	2C	57.0	26.0	8.0	100	1.86	0.08	2C↓	88.0	1.0	0	100
D-1	67	♀	上皮異形成症	2.85	0.68	2C↑	48.0	31.0	6.0	100	2.36	0.43	2C↑	88.9	11.1	0	117
D-2	71	♀	上皮異形成症	3.64	1.90	4C↓	41.0	37.0	11.0	100	3.02	1.50	2C	69.0	22.0	4.0	100
D-3	52	♂	上皮異形成症	2.45	0.80	2C	20.9	27.3	27.3	110	2.04	0.14	2C	40.0	29.0	10.0	100

0.07であった。histogramの分布状態は高1Cから低3Cまでの分布を示し(図1-2)、全症例単峰性でmodeは低2Cから2Cの範囲にあり総合的には低2Cで全症例が2C域であった。2C域および3C域への細胞の収束率は、それぞれ77.0~100%、平均88.7%、0~6.0%、平均1.2%であった。また、over 4Cの高倍体細胞の出現はみられなかった。

すなわち、基底層は有棘層より若干右方に偏る傾向があり、2C域への収束率は有棘層が、3C域への収束率は基底層が多少高かった。

上皮増殖性病変：歯肉の肥厚、増殖を示す病変のうち、その病変の本態が上皮に由来するものは、良性腫瘍の中では上皮の外方への乳頭状の突出を示す乳頭腫が典型的であり、非腫瘍性のもものでは外来性刺激に対する炎症性、反応性増殖性病変として上皮過形成症があげられる。これらの乳頭腫、上皮過形成症を非癌上皮増殖性病変群とした。

2) 非癌上皮増殖性病変群

非癌上皮増殖性病変20例の成績は表3のとおりである。

(1) 上皮過形成症(写真1~2)

上皮過形成症10例における基底層での核DNA量のmeanは1.72~2.38Cの範囲で平均2.10C、varianceは0.12~0.40の範囲で平均0.20であった。histogramの分布状態は1Cから4Cまでの分布を示し(図2-1)、全症例単峰性でmodeは低2Cから高2Cの範囲にあり総合的には2Cで全症例が2C域であった。2C域および3C域への細胞の収束率は、それぞれ58.0~89.0%、平均75.9%、6.0~30.8%、平均16.3%であった。

有棘層での核DNA量のmeanは1.58~1.97Cの範囲で平均1.82C、varianceは0.07~0.21の範囲で平均0.11であった。histogramの分布状態は1Cから高3Cまでの分布を示し(図2-2)、全症例単峰性でmodeは高1Cから2Cの範囲にあり総合的には低2Cであった。2C域および3C域への細胞の収束率は、それぞれ52.0~100%、平均80.9%、0~7.0%、平均2.8%であった。over 4Cの高倍体細胞の出現は基底層、有棘層ともに1例もみられなかった。

すなわち、正常粘膜上皮におけると同様に基底層は有棘層より右方へ偏る傾向があり、2C域への収束率は有棘層が、3C域への収束率は基底層が高かった。

(2) 乳頭腫(写真3, 4)

乳頭腫10例における基底層での核DNA量のmeanは1.95~2.60Cの範囲で平均2.30C、varianceは0.09~0.41の範囲で平均0.30であった。histogramの分布状態は1Cから高4Cまでの分布を示し(図3-1)、全症例単峰性でmodeは低2Cから低3Cの範囲にあり総合的には2Cであった。2C域および3C域への細胞の収束率は、それぞれ45.4~91.0%、平均65.0%、4.0~46.3%、

図3 乳頭腫の核DNA量 histogram

平均26.2%であった。over 4Cの高倍体細胞の出現は3例にみられ、1.9~2.8%、平均2.2%であった。

有棘層での核DNA量のmeanは1.77~2.06Cの範囲で平均1.95C、varianceは0.03~0.22の範囲で平均0.09であった。histogramの分布状態は1Cから4Cまでの分布を示し(図3-2)、全症例単峰性でmodeは低2Cから高2Cの範囲にあり総合的には2Cで全症例が2C域であった。2C域および3C域への細胞の収束率は、それぞれ73.0~100%、平均92.3%、0~9.0%、平均3.4%であった。over 4Cの高倍体細胞の出現は1例もみられなかった。

すなわち、基底層は有棘層よりやや右方へ偏し over 4Cのみられるものがあり、また症例によりばらつきの範囲もやや大きかった。

3) 境界病変群

境界病変26例の成績は表4のとおりである。

(1) 白板症

① 白板症第I度(写真5)

白板症第I度5例における基底層での核DNA量のmeanは2.13~2.93Cの範囲で平均2.39C、varianceは0.09~0.75の範囲で平均0.39であった。histogramの分布状態は高1Cから5Cまでの分布を示し(図4-1)、全症例単峰性でmodeは低2Cから低3Cの範囲にあり総合的には2Cであった。2C域および3C域への細胞の

写真 5 白板症第Ⅰ度 (H-E 染色, 中拡大)

写真 6 白板症第Ⅱ度 (H-E 染色, 中拡大)

図 4 白板症第Ⅰ度の核 DNA 量 histogram

収束率は、それぞれ33.3~88.9%, 平均66.6%, 11.1~45.9%, 平均25.0%であった。over 4Cの高倍体細胞の出現は2例にみられ、3.9%, 12.6%, 平均8.3%であった。

有棘層での核 DNA 量の mean は1.88~2.10Cの範囲

写真 7 白板症第Ⅱ度 (Feulgen 染色, 中拡大)

で平均1.96C、varianceは0.06~0.11の範囲で平均0.08であった。histogramの分布状態は高1Cから高3Cまでの分布を示し(図4.2)。全症例単峰性でmodeは低2Cから2Cの範囲にあり総合的には2Cで全症例が2C域であった。2C域および3C域への細胞の収束率は、それぞれ90.0~97.0%, 平均94.6%, 2.0~10.0%, 平均5.0%であった。over 4Cの高倍体細胞の出現は1例もみられなかった。

なお、症例L-4の基底層は他の4例が2C域にmodeを示すのに対し、3C域にmodeを示し、その分布も5Cまでにおよびover 4Cの細胞出現率も高く、異な

図 5 白板症第Ⅱ度の核 DNA 量 histogram

図 6 白板症第Ⅲ度の核 DNA 量 histogram

った傾向がみられた。

⑥ 白板症第Ⅱ度 (写真 6, 7)

白板症第Ⅱ度 14 例における基底層での核 DNA 量の mean は 1.97~3.65C の範囲で平均 2.33C, variance は 0.13~0.84 の範囲で平均 0.32 であった。histogram の分布状態は高 1C から高 5C までの分布を示し (図 5-1), 全症例単峰性で mode は低 2C から低 4C の範囲にあり総合的には 2C であった。2C 域および 3C 域への細胞の収束率は, それぞれ 7.4~88.3%, 平均 69.0%, 10.9~48.6%, 平均 21.0% であった。over 4C の高倍体細胞の出現は 5 例にみられ, 1.4~22.3%, 平均 7.3% であった。

有棘層での核 DNA 量の mean は 1.74~2.17C の範囲で平均 1.97C, variance は 0.04~0.42 の範囲で平均 0.13 であった。histogram の分布状態は高 1C から 4C までの分布を示し (図 5-2), 全症例単峰性で mode は低 2C から高 2C の範囲にあり総合的には低 2C で全症例が 2C 域であった。2C 域および 3C 域への細胞の収束率は, それぞれ 82.0~100%, 平均 92.1%, 0~17.9%, 平均 6.5% であった。over 4C の高倍体細胞の出現は 1 例もみられなかった。

すなわち, 基底層は有棘層より右方に偏し, over 4C を呈するものもみられた。特に症例, L-6, L-8 の基底

層では 3C 域以上に mode を示し, 他の 12 例とは異なった傾向がみられた。

⑦ 白板症第Ⅲ度 (写真 8)

白板症第Ⅲ度 4 例における基底層での核 DNA 量の mean は 2.21~3.30C の範囲で平均 2.63C, variance は 0.27~0.82 の範囲で平均 0.52 であった。histogram の分布状態は高 1C から低 6C までの分布を示し (図 6-1), 単峰性ないし二峰性で mode は 2C から低 4C の範囲にあり総合的には高 2C であった。2C 域および 3C 域への細胞の収束率は, それぞれ 15.5~72.0%, 平均 49.6%, 20.0~42.3%, 平均 30.6% であった。over 4C の高倍体細胞の出現は 3 例にみられ, 4.0~11.3%, 平均 7.8% であった。

有棘層での核 DNA 量の mean は 1.86~2.04C の範囲で平均 1.97C, variance は 0.07~0.18 の範囲で平均 0.11 であった。histogram の分布状態は 1C から 3C までの分布を示し (図 6-2), 全症例単峰性で mode は低 2C から高 2C の範囲にあり総合的には 2C で全症例が 2C 域であった。2C 域および 3C 域への細胞の収束率は, それぞれ 75.0~97.2%, 平均 85.1%, 1.0~14.0%, 平均 6.2% であった。over 4C の高倍体細胞の出現は 1 例もみられなかった。

すなわち, 基底層は有棘層よりも著しく右方に偏し,

写真 8 白板症第Ⅲ度 (H-E 染色, 中拡大)

写真 9 上皮異形成症 (H-E 染色, 中拡大)

図 7 上皮異形成症の核 DNA 量 histogram

2C 域への収束率は低下し, 3C 域への収束率が増加する傾向であった。特に症例 L-20 の基底層は低 4C に mode を示し, その収束率も低かった。

(2) 上皮異形成症 (写真 9)

上皮異形成症 3 例における基底層での核 DNA 量の

写真 10 上皮内癌 (H-E 染色, 中拡大)

mean は 2.45~3.64C の範囲で平均 2.98C, variance は 0.68~1.90 の範囲で平均 1.13 であった。histogram の分布状態は高 1C から高 7C までの分布を示し (図 7-1), 単峰性, 二峰性, 多峰性の分布パターンで mode は 2C から低 4C の範囲にあり総合的には高 2C であった。2C 域および 3C 域への細胞の収束率は, それぞれ 20.9~48.0%, 平均 36.6%, 27.3~37.0%, 平均 31.8% であった。over 4C の高倍体細胞の出現は全症例にみられ, 6.0~27.3%, 平均 14.8% であった。

有棘層での核 DNA 量の mean は 2.04~3.02C の範囲

写真 11 高分化型扁平上皮癌 (H-E 染色, 中拡大)

写真 12 中分化型扁平上皮癌 (H-E 染色, 中拡大)

写真 13 低分化型扁平上皮癌 (H-E 染色, 中拡大)

図 8 上皮内癌の核 DNA 量 histogram

で平均2.47C, varianceは0.14~1.50の範囲で平均0.69であった。histogramの分布状態は高1Cから高7Cまでの分布を示し(図7-2), 単峰性ないし二峰性でmodeは2Cから高2Cの範囲にあり総合的には2Cで全症例が2C域であった。2C域および3C域への細胞の収束率は, それぞれ40.0~88.9%, 平均66.0%, 11.1~29.0%, 平均20.7%であった。over 4Cの高倍体細胞の出現は2例にみられ, 4.0%, 10.0%, 平均7.0%であった。

すなわち, 基底層は有棘層に比して明らかに右方へ偏し, 2C域への収束率の低下, 3C域への収束率の増加

を示すが, 有棘層においても over 4Cを示し明らかに右方へ偏するものがみられた。

4) 癌 腫

(1) 上皮内癌(写真10)

上皮内癌3例について基底膜に隣接する部分, すなわち基底層相当部の細胞と有棘層の部分に位置する有棘層相当部の細胞の核DNA量をおのおの測定した。測定成績は表5のとおりである。

上皮内癌3例における基底層相当部での核DNA量のmeanは2.30~2.50Cの範囲で平均2.41C, varianceは0.35~0.62の範囲で平均0.47であった。histogramの分布状態は1Cから低7Cまでの分布を示し(図8-1), 単峰性ないし二峰性の分布パターンでmodeは2Cから高2Cの範囲にあり総合的には2Cであった。2C域および3C域への細胞の収束率は, それぞれ56.0~68.0%, 平均62.0%, 21.0~35.0%, 平均27.0%であった。over 4Cの高倍体細胞の出現は全症例にみられ, 平均2.0%であった。

有棘層相当部での核DNA量のmeanは2.04~2.48Cの範囲で平均2.23C, varianceは0.23~0.54の範囲で平均0.40であった。histogramの分布状態は高1Cから高5Cまでの分布を示し(図8-2), 単峰性ないし二峰性の分布パターンでmodeは低2Cから高2Cの範囲にあり

表 5 癌腫の細胞核

症例 No.	年 齢	性	組 織 診 断 名	癌 巢 外 層 (基底層相当部)				
				mean (C)	variance	histogram		
						Mo	2C域 (%)	3C域 (%)
C-1	56	♂	上 皮 内 癌	2.43	0.44	2C↑	62.0	25.0
C-2	86	♀	上 皮 内 癌	2.30	0.62	2C	68.0	21.0
C-3	50	♂	上 皮 内 癌	2.50	0.35	2C↑	56.0	35.0
S-1	88	♀	高分化型扁平上皮癌	2.63	1.09	2C↓	57.9	27.1
S-2	55	♂	高分化型扁平上皮癌	3.23	1.65	2C↑, 3C↓	32.1	39.4
S-3	86	♀	高分化型扁平上皮癌	2.89	0.66	3C↓	31.0	53.0
S-4	68	♀	高分化型扁平上皮癌	2.60	0.77	2C↑	52.0	29.0
S-5	68	♀	高分化型扁平上皮癌	3.58	1.87	3C	17.8	42.1
S-6	66	♂	高分化型扁平上皮癌	2.55	0.67	2C	60.9	27.3
S-7	65	♀	高分化型扁平上皮癌	2.60	1.25	2C↓	58.0	29.0
S-8	50	♀	高分化型扁平上皮癌	2.97	1.28	2C↑	36.0	40.0
S-9	63	♂	高分化型扁平上皮癌	2.86	1.09	2C↑	47.2	26.9
S-10	69	♀	高分化型扁平上皮癌	4.61	2.56	3C, 3C↑ 4C, 4C↑, 5C	6.7	21.5
S-11	58	♀	高分化型扁平上皮癌	2.57	0.67	2C	53.9	34.3
S-12	70	♂	高分化型扁平上皮癌	3.32	1.23	3C↓	22.7	31.8
S-13	67	♂	高分化型扁平上皮癌	2.46	0.47	2C	61.0	26.0
S-14	54	♀	中分化型扁平上皮癌	4.46	2.80	4C	6.0	24.0
S-15	55	♂	中分化型扁平上皮癌	3.18	1.99	2C↑	39.1	30.0
S-16	67	♂	中分化型扁平上皮癌	7.55	8.01	7C↑	1.0	6.0
S-17	53	♀	中分化型扁平上皮癌	4.39	2.48	3C 4C↑, 5C↓	8.0	20.0
S-18	42	♂	中分化型扁平上皮癌	3.23	1.77	2C↑	31.8	34.5
S-19	49	♀	中分化型扁平上皮癌	2.45	0.44	2C↓, 2C↑	58.3	33.9
S-20	51	♂	中分化型扁平上皮癌	3.14	2.02	2C, 2C↑	35.5	32.7
S-21	75	♀	中分化型扁平上皮癌	2.37	0.55	2C↓	68.9	22.6
S-22	60	♂	中分化型扁平上皮癌	3.98	2.52	3C↓, 4C↓	17.3	24.5
S-23	60	♂	中分化型扁平上皮癌	3.64	2.39	3C	21.8	28.2
S-24	31	♀	中分化型扁平上皮癌	3.91	2.25	4C↓	18.0	20.0
S-25	70	♀	低分化型扁平上皮癌	3.21	1.60	3C↓, 3C	29.4	38.5
S-26	45	♂	低分化型扁平上皮癌	2.87	1.28	2C↓	38.0	35.0

() は上皮内癌の場合

総合的には2Cであった。2C域および3C域への細胞の収束率は、それぞれ65.0～82.0%，平均74.6%，9.0～22.0%，平均15.7%であった。over 4Cの高倍体細胞の出現は1例にみられ、4.0%であった。

すなわち、基底層相当部、有棘層相当部ともにこれまでの非癌各群よりも右方へ偏し、特に有棘層相当部ではmean, variance および3C域への収束率が増加してみられた。

(2) 扁平上皮癌(写真11～13)

26例の歯肉扁平上皮癌において、高分化型は癌巢の外

方から内方に向かって明らかなstratificationを呈し、癌巢の中心部では角化傾向を有し、癌真珠の形成が大部分の症例にみられた。したがって核DNA量の測定に際して癌巢の基底細胞様の形態を呈する外層の数層と癌巢内で明瞭に細胞間橋が認められ有棘細胞様の形態を呈する内層とを区別しておのおのの癌細胞を測定した。中分化型ならびに低分化型では高分化型に比べ明瞭なstratificationを呈さず、細胞間橋も分化度が低くなるに従い不明瞭な症例もみられたが、核DNA量の測定は可能な限り癌巢の外層と内層を区別して行った。

DNA 量

		癌 巢 内 層 (有棘層相当部)						
OV 4C (%)	細 胞 測定数	mean (C)	variance	histogram				細 胞 測定数
				Mo	2C域 (%)	3C域 (%)	OV 4C (%)	
2.0	100	2.48	0.54	2C↑	65.0	22.0	4.0	100
2.0	100	2.04	0.23	2C	77.0	16.0	0	100
2.0	100	2.16	0.43	2C↓	82.0	9.0	0	100
6.5	107	2.87	1.44	2C↑	50.5	25.7	15.6	109
21.1	109	2.44	0.67	2C↑	61.8	30.9	3.6	110
6.0	100	3.15	0.30	3C↑	13.6	59.1	2.7	110
7.0	100	2.42	0.88	2C	52.0	25.0	8.0	100
26.2	107	2.69	0.86	2C	49.7	32.6	8.8	181
7.3	110	2.09	0.29	2C↓	86.0	10.0	2.0	100
10.0	100	2.70	1.57	2C↑	60.9	14.8	14.8	128
13.0	100	2.10	0.33	2C	72.0	14.0	1.0	100
10.2	108	2.18	0.34	2C↓	75.0	23.0	1.0	100
56.4	149	3.82	1.77	4C↑	16.9	23.8	44.4	160
5.5	102	2.53	0.89	2C↑	61.7	27.5	3.0	167
22.7	110	3.00	1.47	2C↑	44.9	30.8	13.1	107
2.0	100	2.02	0.17	2C	81.0	9.0	0	100
45.0	100	3.20	1.62	2C↑	36.4	30.9	20.0	110
21.8	110	2.93	1.24	2C	44.1	35.1	13.5	111
88.0	100	7.64	6.24	7C↓	0	1.0	96.0	100
53.0	100	2.80	1.17	2C	55.1	21.9	14.0	178
21.8	110	2.39	0.72	2C	69.0	18.0	5.0	100
1.0	103	2.12	0.38	2C↓	73.6	15.5	1.8	110
14.5	110	3.35	2.30	3C↓	31.8	35.5	19.1	110
3.8	106	2.16	0.71	2C↓	75.5	14.5	1.8	110
39.1	110	3.50	1.15	4C↓	18.2	31.8	26.4	110
29.1	110	2.41	0.51	2C	69.5	17.2	1.7	174
39.0	100	3.55	1.93	2C↑	30.1	22.3	35.0	103
16.4	109	3.00	1.78	2C↑	42.7	39.1	11.8	110
11.0	100	2.88	1.10	2C↑	43.5	33.3	10.2	108

扁平上皮癌26例の成績は表5のとおりである。

④ 高分化型扁平上皮癌

高分化型13例における外層での核 DNA 量の mean は 2.46～4.61C の範囲で平均 2.99C, variance は 0.47～2.56 の範囲で平均 1.17 であった。histogram の分布状態は高 1C から低 9C までの分布を示し (図 9-1), 単峰性, 二峰性, 多峰性の分布パターンで, mode は低 2C から 5C の範囲にあり総合的には高 2C であった。2C 域および 3C 域への細胞の収束率は, それぞれ 6.7～61.0%, 平均 41.3%, 21.5～53.0%, 平均 32.8% であった。over

4C の高倍体細胞の出現は全症例にみられ, 2.0～56.4%, 平均 14.9% であった。

内層での核 DNA 量の mean は 2.02～3.82C の範囲で平均 2.62C, variance は 0.17～1.79 の範囲で平均 0.84 であった。histogram の分布状態は高 1C から 8C までの分布を示し (図 9-2), 単峰性から多峰性の分布パターンで mode は低 2C から高 4C の範囲にあり総合的には 2C であった。2C 域および 3C 域への細胞の収束率は, それぞれ 13.6～86.0%, 平均 55.8%, 9.0～59.1%, 平均 25.1% であった。over 4C の高倍体細胞の出現は 12

図9 高分化型扁平上皮癌の核 DNA 量 histogram

図11 低分化型扁平上皮癌の核 DNA 量 histogram

図10 中分化型扁平上皮癌の核 DNA 量 histogram

例にみられ、1.0~44.4%，平均9.8%であった。

外層と内層を比較すると、核 DNA 量の mean は13例中10例は外層が内層より高値であり、histogram の分布域も10例は外層の方が広がった。2C域に mode を示したものは外層は8例、内層は11例であった。

⑥ 中分化型扁平上皮癌

中分化型11例における外層での核 DNA 量の mean は2.37~7.55C の範囲で平均3.85C，variance は0.44~8.00の範囲で平均2.47であった。histogram の分布状態は高1Cから低16Cまでの分布を示し（図10-1），単峰性から多峰性の分布パターンで mode は低2Cから高7Cの範囲にあり総合的には高2Cであった。2C域および3C域への細胞の収束率は、それぞれ1.0~68.9%，平均27.8%，6.0~34.5%，平均25.1%であった。over 4C の高倍体細胞の出現は全症例にみられ、1.0~88.0%，平均32.4%であった。

内層での核 DNA 量の mean は2.12~7.64C の範囲で平均3.28C，variance は0.51~6.24の範囲で平均1.63であった。histogram の分布状態は高1Cから15Cまでの分布を示し（図10-2），単峰性から多峰性の分布パターンで mode は低2Cから低7Cの範囲にあり総合的に

は2Cであった。2C域および3C域への細胞の収束率は、それぞれ0~75.5%，平均45.8%，1.0~35.5%，平均22.2%であった。over 4C の高倍体細胞の出現は全症例にみられ、1.7~96.0%，平均21.3%であった。

外層と内層を比較すると、核 DNA 量の mean は11例中9例は外層が内層より高値であり、histogram の分布域も9例は外層の方が広がった。2C域に mode を示したものは外層が5例で内層は8例であった。

⑦ 低分化型扁平上皮癌

低分化型2例における外層での核 DNA 量の mean は2.87Cおよび3.21Cで平均3.04C，variance は1.28および1.60で平均1.44であった。histogram の分布状態は高1Cから9Cまでの分布を示し（図11-1），ともに多峰性で mode は低2C，低3Cないし3Cで総合的には低3Cであった。2C域および3C域への細胞の収束率は、前者が29.4%，38.0%で平均33.7%，後者は35.0%，38.5%で平均36.8%であった。over 4C の高倍体細胞の出現は両症例にみられ、11.0%および16.4%で平均13.7%であった。

内層での核 DNA 量の mean は2.88Cおよび3.00Cで平均2.94C，variance は1.10および1.78で平均1.44であった。histogram の分布状態は低2Cから高11Cまでの分布を示し（図11-2），ともに多峰性で mode は両症例とも高2Cであった。2C域および3C域への細胞の収束率は、前者が42.7%，43.5%で平均43.1%，後者が33.3%，39.1%で平均36.2%であった。over 4C の高倍体細胞の出現は両症例ともにみられ、10.2%および11.8%で平均11.0%であった。

外層と内層を比較すると、histogram の分布域は両症例とも内層が外層よりも広がった。

第3章 考 案

1) 測定方法について

細胞内に存在する特定物質を顕微鏡下で微量定量する

方法は大きく顕微分光測光法、顕微干涉測光法、顕微蛍光測光法の3つに分類される。細胞核 DNA 量の定量には顕微分光測光法が広く用いられてきたが、現在ではさらに精度の高い顕微蛍光測光法がその測定法の主流になってきている。

顕微蛍光測光法の利点は蛍光物質に特有な波長の励起光を照射すると、一定の条件下では蛍光物質の量に比例した特異的な蛍光を発するため、不均一な分布を呈する物質を分布誤差なく、走査用の装置を要せずに定量できることにあり、さらに落射型顕微蛍光測光法は入射光が直ちに対象物に当たるため、非特異的な光喪失がきわめて少ないとされている¹⁾。

また以前より問題とされていた蛍光物質が不安定なために起こる蛍光の減衰と back ground から発する非特異蛍光については、post-irradiation 処理²⁾により、蛍光の安定化と非特異蛍光の消失が可能となった。

本研究は以上の点を勘案して蛍光測光法によったものであり、データをコンピュータ処理するために、BHS 顕微鏡と落射蛍光測光ヘッド(QRFL-MH)、コントロールボックス(QRFL-CB)にデスクトップコンピュータ HP 85 を接続したオリンパス光学社製落射型顕微蛍光測光装置(OLYMPUS BH 2 QRFL SYSTEM)を使用した。

2) 測定対象について

従来から核 DNA 量の測定における標本の作製には stump method, smear method, culture method などが用いられており、特に近年では組織切片を酵素処理し超音波装置を用いて分離した単離細胞を測定する方法なども行われるようになってきた。また、一方では組織検索に用いた同一断面より得られた薄切組織標本を用いて直接目標とする細胞を測定する方法もあり、この2者は互いに長短得失が論ぜられている。すなわち、前者は目標とする個々の細胞が分離した状態であるため、測定が容易で細胞の重なりがないことから測定誤差が少ないという利点があるが、細胞由来の決定や測定対象細胞の鑑別同定が困難な場合があるなどの欠点がある。一方後者は測定対象細胞の選択が可能であり、その病態像および周囲との関連性を把握、確認しながら測定することができる利点があるが、細胞の重なり、標本作製時の artifact による測定値の誤差を生じやすい。

以上のごとく、両者はそれぞれに利害得失が考えられるが、現実的には中村³⁾は子宮腔部病変における核 DNA 量とその histogram pattern の検索に際して両者は概して近似した成績を示したと報告している。

本研究では歯肉における癌腫、前癌性病変を中心に種々な病変の被覆重層扁平上皮細胞の核 DNA 量と細胞ならびに組織構造の分化度との関連性を観察することを目的としたため、薄切組織標本を測定対象に用い、測定に際しては可及的に細胞の重なりがなく細胞核に切断のな

いものについて測定を行った。

3) 測定部位について

重層扁平上皮細胞は分化の段階に従って層を作って配列し、細胞更新のための増殖細胞帯は基底層にあり^{4,5)}、表層細胞の剝離脱落と併行して分裂し、2個の娘細胞のうち1個はその位置に残り、一方は押し上げられて有棘細胞となる。有棘細胞はつぎつぎと押し上げられて表層に近づくが、これとともに細胞は分化成熟を遂げる⁶⁾と考えられている。

本研究では細胞の分化成熟状態に応じて重層扁平上皮では基底層、有棘層について、また癌腫では癌巣を外層と内層とに区分して、そのおのおので細胞の核 DNA 量を測定した。なお、白板症第Ⅲ度および上皮異形成症では特に異型細胞のみについても核 DNA 量の測定を行った。

4) 測定成績について

Feulgen 反応において Schiff 試薬は核 DNA に特異的かつ定量的に結合する⁷⁾とされ、最近ではこの Feulgen 反応を厳密な条件下で行い、精密な測光機器で測定すると細胞分裂サイクルに由来する核 DNA 量の変動から細胞増殖動態の推定が可能になってきている⁸⁻¹⁰⁾。

正常な増殖細胞は静止期 (G_0 期)、合成前期 (G_1 期)、合成期 (S 期)、合成後期 (G_2 期)、分裂期 (M 期) を経て細胞分裂を行っている。すなわち、 G_0 期の細胞が分裂増殖刺激を受けた時の核 DNA の消長をみると、 G_1 期で2倍体 (2C, diploid)、S 期では2倍体から4倍体 (4C, tetraploid) に倍増され、 G_2 期では4倍体になり、分裂して再び2倍体になる。したがって理論上 over 4C の高倍体細胞は正常な細胞回転 (cell cycle) から逸脱した細胞と考えられる。

なお、本研究において2Cの決定に同一標本中の小リンパ球を用いたのは従来の多くの研究者と同様にこれが通常、生体内で最も普遍的に認められる細胞であり、かつ核 DNA 量が最も安定していると考えられていることによっている。

(1) 正常歯肉粘膜について

10例の正常歯肉粘膜上皮の核 DNA 量の mean, variance はともに全症例において基底層が有棘層に比べ高値であった。histogram の分布状態は全症例が基底層、有棘層ともに低2Cないし高2Cの2C域に mode を示す単峰性の分布パターンを呈したが、基底層と有棘層を比較すると mode は基底層がより高値にあり、さらに3C域にわたる細胞の割合も高い傾向を示していた。また、4Cを越える高倍体細胞は基底層、有棘層ともにみられなかった。

笹井⁶⁾、野口¹¹⁾は正常表皮における核 DNA 量は基底層細胞において最も高く有棘層細胞、顆粒層細胞と表層に向かって漸減することを示しており、口腔領域においても Gimenez ら¹²⁾、北島¹³⁾はそれぞれ歯肉、舌の重層

扁平上皮の細胞核 DNA 量の測定の結果、基底層、有棘層の mode は同じ 2 C にあるが、mean は基底層では cell cycle の S 期、 G_2 期の細胞が存在するために有棘層よりも高値を示したと報告しており、本研究も同様の結果であった。

このように正常粘膜上皮では基底層が有棘層に比べ mean, mode とともに高値を示し、分布域も広いことは基底層での細胞増殖能が高いことを示唆するとともに、この核 DNA 量の細胞層による変動パターンは上皮細胞の分化成熟を反映しているものと考えられる。

なお、有棘層が基底層より低い核 DNA 量を示すことに関して、表皮上層は deoxyribonuclease (DNase) 活性が高いために表皮細胞の成熟過程の進行に伴って核 DNA 量が減少する可能性も考えられる⁴⁾とするものもあるが、本研究の成績からは考察の域をこえたものといえよう。

(2) 上皮増殖性病変について

非癌上皮増殖性病変群：上皮過形成症における核 DNA 量は mean, variance の最低値、最高値ともに基底層は有棘層に比して高く、個々の症例においても同様の関係を示した。histogram の分布状態は基底層では全症例が 2 C 域に mode を示し、有棘層では 8 例、80% がこの領域に mode を示す単峰性の分布であり、基底層と有棘層を比較すると、基底層の方が mode も高く、分布域も広い傾向を認めるがその範囲は正常の cell cycle にみられる 4 C を越えて分布することはなく、正常歯肉粘膜上皮に酷似した分布パターンを呈した。

乳頭腫は口腔領域において最も頻度の高い良性の上皮性腫瘍とされ¹⁴⁾、この名称は本来、成熟型上皮性新生物で真の腫瘍のみに用いるべきであるとされているが臨床的には非腫瘍性の乳頭状増殖も含まれ、また、これらの鑑別は必ずしも容易ではないとされている¹⁵⁾。さらに組織学的には異角化や細胞異型が認められる点で悪性潜在能の可能性があるとする説^{14,16)}、一方、生物学的性状、病理組織学的所見および臨床経過から良性病変であるとして悪性化を否定するもの^{17,18)}もあって、良性病変の根本的な意味の解釈とも相俟って諸家によりその見解は一致していない。

細胞異型に関しては、Abbey ら¹⁹⁾は乳頭腫 176 例中、軽度の上皮細胞異型を 25% 以上に認め、著明な異型性は 2% 以下であったとしているが、異型細胞の発現が悪性化を象徴するものか、あるいは腫瘍の増殖活性の増大によるものかは明らかではないとしている。また、Macdonald ら²⁰⁾は 10 例の義歯による上皮性病変において異型性の組織学的変化が認められたことから、軽度の細胞異型は反応性変化に関連したものであると報告している。

今回の研究では、10 例の乳頭腫における光顕的観察において異角化、異常分裂および上皮細胞異型の像は認められなかった。

核 DNA 量については、mean, variance は全症例とも基底層が有棘層に比べ高値であった。mode は 1 例の基底層を除いて全症例が 2 C 域にみられた。高 2 C 以上に mode を示した症例は基底層では 5 例、50% であるのに対し、有棘層では 1 例、10% と基底層および有棘層はともに同じ 2 C 域に mode を示すものの明らかに基底層に高い DNA 量値を示すものが多く認められた。乳頭腫における基底層と有棘層の差は上皮過形成症より大であり、2 C 域への細胞の収束率は、有棘層は基底層に比べて著しく高く大部分が G_0+G_1 期の細胞であると考えられ、一方、基底層では 3 C 域への収束が多くみられ、これは 2 C 域 (G_0+G_1 期) の細胞が S 期に入ったものが多く含まれていると考えられる。3 C 域への収束率からみて乳頭腫の基底層における S 期の細胞は上皮過形成症に比して乳頭状増殖を示す乳頭腫の増殖力を反映しているものと推測される。

非癌上皮増殖性病変群における各病態間の比較を基底層について行くと、上皮過形成症、乳頭腫は正常粘膜上皮に比べ核 DNA 量の mean, variance は高値であったが、分布状態は 3 者とも同じ 2 C に mode を示した。2 C 域への細胞の収束率は正常粘膜上皮が最も高く、次いで上皮過形成症、乳頭腫の順であり、一方 3 C 域への細胞の収束率は、乳頭腫が最も高く、次いで上皮過形成症、正常粘膜上皮の順であった。したがって基底層において乳頭腫は上皮過形成症より DNA 量の増加および細胞の高倍体側への偏位による分布域の拡大傾向を示した。同様に病態間の比較を有棘層について行くと、ともに若干の増加はみられ乳頭腫がより強いが、variance の差は少なく、その分布域も 4 C 以内で分布パターンは類似していた。すなわち、有棘層では基底層と異なりそれぞれの病態間に大きな相違は認められなかった。

境界病変群：白板症とは臨床的にも病理組織学的にも他の疾患の特性を示さない白色斑あるいは白色苔で上皮異形成の有無は問わないと定義されており²¹⁾、その発症は歯肉に最も多いといわれている²²⁾。

白板症の悪性化潜在能について Chierici ら²³⁾は 874 例の扁平上皮癌においてその 15% は白板症に直接関連し、その部位は歯肉および歯槽粘膜での発症が高いと述べている。その他にも白板症と癌との関連性を述べる報告は多く^{21-29,45,47,48,52)}、組織学的にも病変の一部に異角化症がみられるものが存在することから以前より口腔白板症は前癌性病変の代表的疾患として認識されてきている。白板症の悪性化率は経過観察期間においても異なり、0.13~17.5% と報告者によってその頻度はさまざまである²⁴⁾。悪性化するものは臨床的には erosive type²⁵⁾、speckled type²⁴⁾に多く、組織学的には上皮異形成を呈するものに高いとされ、その割合は、Silverman ら²⁶⁾は 36.4%、Banoczy ら²⁶⁾は 13.2% であったと報告している。しかし逆に異形成がみられなかった白板症からの癌

化が認められること^{24,28)}, また Mehta ら²⁷⁾は20例の上皮異形成を伴った161例の白板症における5年間の経過観察の結果, 悪性化した症例はなかったと報告している。したがって現時点では光顕的観察のみでは白板症の悪性化を推測することは容易ではないと考えられている。

白板症は病理組織学的に上皮の増殖状態, その程度, 上皮異形成の有無等を中心に種々の分類がなされているが, Shklar¹⁰⁾は上皮の増殖状態, 細胞異型, 上皮下の細胞浸潤等の所見によって分類を行っている。

本研究においては, 白板症を異角化と炎症性細胞浸潤の有無によって組織学的に3群に大別した。すなわち, 上皮細胞に異角化症がなく, 上皮下に炎症性細胞浸潤のみられないⅠ度, 異角化症がなく炎症性細胞浸潤を伴うⅡ度, 一部に異角化症のみられるⅢ度である。これらの核 DNA 量を比較検討した結果, 基底層では第Ⅰ度と第Ⅱ度は mean, variance にはほとんど差がなく, その分布域も等しく, さらに両者とも全症例の60%以上が4C以内の分布を示し, その分布パターンも近似していたのに対し, 第Ⅲ度は第Ⅰ度, 第Ⅱ度に比べ, mean, variance とともに高く, 分布域も広く, 75%の症例に over 4Cを示す細胞の出現がみられた。さらに第Ⅲ度における細胞の収束率は, mode を有する2C域への収束率が低下し, 3C域への収束率の著明な増加が認められた。有棘層では第Ⅰ度, 第Ⅱ度, 第Ⅲ度の間に著しい相違は認められなかった。

また, 異角化症を伴わない第Ⅰ度, 第Ⅱ度と非癌上皮増殖性病変群を比較すると, 第Ⅰ度, 第Ⅱ度の基底層は分布域が多少ともより拡大しているが, これら3者の基底層ならびに有棘層はそれぞれ単峰性の類似した分布パターンを呈していた。

Saku ら²⁹⁾は白板症の癌化過程における核 DNA 量の測定の結果, 癌化した異形成を伴った白板症は癌化しなかったものに比べ2.5~3.5C域と高4Cの細胞の割合が増加し model peak を2ヶ所に示したと報告している。

本研究においても角化異常, 細胞異型などの異角化症を伴った第Ⅲ度は, その基底層において核 DNA 量の増加, mode の右方偏位, 3C域細胞の割合の増加, 高倍体細胞の出現などの変化が認められた。これらの変化は後述する癌腫での変化に類似した傾向を示すものであり, 悪性化への高い risk を示唆するものと考えられる。

また, 第Ⅰ度, 第Ⅱ度の基底層では, over 4Cの高倍体細胞が出現し, histogram の分布パターンも高倍体側へ偏位する傾向を示す症例がみられた。

軽度から中等度の異形成のみられる上皮異形成症の核 DNA 量は, 基底層では白板症第Ⅲ度に比べ mean, variance は高く, その分布域も7C域までに拡大し, over 4Cの高倍体細胞は全症例にみられた。有棘層は基底層に比べ, mean, variance は低値ではあるが, 正常粘膜

上皮, 非癌上皮増殖性病変群, 白板症とは異なり, 分布域は拡大し3C域への細胞の収束率の増加を示した。一戸ら³⁰⁾は子宮頸部の異形成病変において, 表層, 中間層, 深層の核 DNA 量を測定した結果, 異形成が高度になるに従って深層での分散が広く, 高度異形成では上皮内癌や浸潤癌と変わらない分布を示したと報告している。本研究では上皮異形成症は基底層のみならず有棘層においても明らかな核 DNA 量の増加, 分布域の拡大がみられ, その分布パターンも多様性傾向を示し癌腫に類似する症例も認められた。

(3) 癌腫について

上皮内癌では, 中村³⁾は子宮頸部における核 DNA 量について変異幅の拡大と著明な mode を示さない背の低い分布を示し, その変異の程度は高度異形成と同一のものから扁平上皮癌に類似するものまでみられたと述べている。また, 一戸ら³⁰⁾は子宮頸部の上皮層の深層から表層までの層に関係なく核 DNA 量の分布幅はきわめて広く, 各層とも高度異形成症の深層細胞と同じ分散を呈したと報告している。一方口腔領域においては婦人科領域に比べ上皮内癌の報告は少ないが Kramer³¹⁾は子宮頸部の上皮内癌と口腔粘膜のものとを比較し, 口腔領域における上皮内癌の方が浸潤癌への進展の割合が高いと述べている。

本研究では基底層相当部と有棘層相当部ともに mode は同じ2Cにあり, mean, variance もほぼ近似した値を示した。細胞の収束率は有棘層相当部に比べ基底層相当部がやや低下する傾向であった。有棘層相当部の3C域への収束率は基底層相当部にはおよばないものの, その割合は10%以上で有棘層相当部における核 DNA 量の明らかな増加が認められた。すなわち, 基底層相当部, 有棘層相当部の分布パターンは類似し, 層に関係なく上皮全体に核 DNA 量の増加がみられたが症例数が少なくこの癌腫での特徴的な傾向を把握するには至らなかった。

扁平上皮癌における核 DNA 量については多くの研究者により正常細胞ないし良性癌腫細胞に比較して増加しているという報告がなされている。本研究においても, 正常粘膜上皮, 非癌上皮増殖性病変群, 境界病変群に比べ扁平上皮癌の核 DNA 量は高値を示し, その histogram の分布パターンは症例によって異なり多様性傾向を示した。

組織学的分化度と核 DNA 量の関係についてみると, 中村³⁾は子宮頸癌で, 奴田原³²⁾は子宮内膜癌で, 三谷³³⁾は卵巣の単純性原発癌で, 徳岡³⁴⁾は胃癌で, それぞれ組織学的分化度と核 DNA 量の間には明らかな相関がみられなかったと報告している。それに対して, 乳癌では Baquoi ら³⁵⁾, 胃癌では佐々木ら³⁶⁾, 前立腺癌では Zetterberg ら³⁷⁾, 膀胱癌では Fossa³⁸⁾は分化度と DNA パターンとの関係がみられたとし, 小中³⁹⁾は mode の位置

とそこに占める細胞の割合において分化度の推定が可能であると述べ、高橋⁴⁰⁾は低分化型腺癌では高倍体の DNA パターンを示すものが多いと報告している。食道の扁平上皮癌では、Sugimachi ら⁴¹⁾は核 DNA histogram のピークの位置と分布幅について分類した結果、未分化なもの程、多峰性で扁平化した分布幅の広い分布パターンを呈すると報告している。口腔領域においては、上顎癌では遠藤⁴²⁾は中分化型扁平上皮癌に核 DNA 量が高く、分布幅の広いものが多い傾向を示したとしている。舌癌では北島¹³⁾は癌巣内層は非高分化型と高分化型の histogram の mode の位置に相違がみられたと報告しているが、口腔領域での組織分化度と核 DNA 量との関連性についての細かな検討を行った報告は少ない。

本研究は組織分化度により扁平上皮癌を高分化型、中分化型、低分化型の3型に分類し、それぞれ癌巣の外層と内層における核 DNA 量を比較検討した。

分化の程度における核 DNA 量の mean は中分化型に高値を示す症例が多く認められた。癌巣の外層と内層を比較すると、高分化型では85%、中分化型では82%の症例で外層が内層よりも高く、正常粘膜上皮の基底層と有棘層の関係に類似した傾向がみられた。これは扁平上皮癌においても、比較的分化度の高いものでは癌巣を形成する細胞の分化勾配に応じた核 DNA 量の変動を示すものと考えられる。

悪性腫瘍での核 DNA 量の分布パターンについては、佐々木ら⁴⁴⁾は小粘膜胃癌では悪性度の高いものは高倍体域への peak の偏位と分布幅の著しい拡大を示すとして分布パターンと悪性度との間に関係がみられたと述べており、口腔領域の扁平上皮癌においても多くの報告がみられる^{13,45-53)}。本研究では高分化型、中分化型、低分化型のいずれの分布パターンも分布幅の広いものが多く、そのなかでも中分化型に最も分布域の拡大する傾向が認められた。さらに、これらの癌巣外層と内層を分けて観察すると、高分化型、中分化型では症例の77%以上で癌巣外層が内層に比べ分布域が拡大しているのに対し、低分化型では癌巣内層の方が外層よりも分布域が拡大していた。これらの分布域の拡大の理由としては aneuploid および polyploid 細胞の出現があげられる。これについては癌細胞における染色体数の変化、染色体の構造上の変化⁵⁴⁾、分裂異常、特に染色体の不均等分離または不分離などに由来する可能性が考えられる。

histogram の mode は、癌細胞の集団の中で増殖の主体をなす細胞群である stem line cell を意味し、その cell cycle の G_0+G_1 期の細胞に相当すると考えられている^{52,56)}。stem line cell について、牧野⁵⁵⁾は体細胞が悪性化した時点で生じ、それぞれの癌に特有な一定の染色体を保持し、その増殖に第一義的な役割を果たすとともにその癌の性格を特徴づけるものであるとしている。また、二峰性、多峰性の分布パターンを呈するものは

stem line cell が1系でなく複数存在している可能性が考えられる。本研究において扁平上皮癌の分布パターンは単峰性、二峰性、多峰性を呈するものなど種々みられ、その多様性傾向を認めた。histogram の mode を3C域以上の高倍体域に示したものは、高分化型の癌巣外層では38%の症例に、中分化型の癌巣外層では55%の症例にみられた。さらに低分化型全体の癌巣外層は3C域に mode を示し、その他にもいくつかの peak を有する分布パターンを呈した。また、扁平上皮癌における細胞の収束率は低下する傾向を示し、その傾向は分化度が低くなるに従い強くなりみられた。

すなわち、扁平上皮癌における組織分化度と核 DNA 量の分布パターンとの関係は分化度が低下するに従い癌巣外層の mode は右方に偏位し、扁平化する傾向が認められた。

aneuploid, polyploid 細胞の出現についてみると、3C域への細胞の収束率では扁平上皮癌の癌巣内層は前述した正常粘膜上皮、非癌上皮増殖性病変群および境界病変群における有棘層の割合よりも高いものが多くみられた。これは癌巣内層では多くの症例が G_0+G_1 期に相当する mode を2C域に示すことにより、3C域の細胞はS期に相当する細胞と考えられ、従って癌巣内層では合成期の細胞が増加しているものと推測される。

4Cを越える高倍体細胞は、cell cycle から4Cを良性、悪性の境界値として over 4Cの高倍体細胞の出現する割合を悪性の判定基準とする報告が多くみられる^{3,8,32,33,39,40,42)}。本研究では over 4Cの高倍体細胞は、中分化型、低分化型では100%の症例に出現し、その割合は中分化型に最も高く認められた。さらに癌巣外層と内層を比較すると、癌巣外層がより高い割合を示す傾向であった。

結 語

歯肉の癌腫およびその境界病変の細胞核 DNA 量を測定し、組織像と対比して細胞の成熟度ならびに組織分化度との関係を検討した。

本研究では、癌腫29例、境界病変として白板症23例、上皮異形成症3例の計26例、非癌上皮増殖性病変として上皮過形成症、乳頭腫のおおの10例ずつ計20例、正常歯肉粘膜10例、計85例について観察した。癌腫では癌巣を外層と内層に分けてそれぞれの癌細胞を、また、他の症例では上皮の基底層と有棘層を分けておのおのの細胞の核 DNA 量を蛍光測光法で測定し以下の成績を得た。

1. 正常歯肉粘膜上皮の核 DNA 量は基底層は有棘層よりも増加し、その histogram は基底層が2C、有棘層は低2Cに mode をもつ傾向であったが、ともに単峰性で4C以内に限局分布していた。
2. 非癌上皮増殖性病変群の核 DNA 量は基底層は有

棘層よりも増加し、乳頭腫、上皮過形成症の順に高い傾向を示し、いずれも正常粘膜上皮に比べ高い値を示した。

3. 境界病変群の核 DNA 量は基底層が有棘層よりも増加していた。白板症第Ⅰ度、第Ⅱ度は正常粘膜上皮に比べ、核 DNA 量の軽度の増加がみられたが、白板症第Ⅲ度では基底層に、また上皮異形成症では基底層、有棘層ともに核 DNA 量の増加がみられ、癌腫に類似する変化が認められるものがあった。

4. 上皮内癌の核 DNA 量は有棘層相当部と基底層相当部の値が近似し、その histogram の分布パターンも類似していた。

5. 扁平上皮癌の核 DNA 量は概して高値を示すが、なかには正常粘膜上皮に類似するものもみられ、histogram の分布パターンも症例によって異なり、多様性傾向を示した。

6. 扁平上皮癌における組織分化度と核 DNA 量との関係は、高分化型、中分化型では82%以上の症例で癌巢外層の核 DNA 量が癌巢内層よりも高値を示した。histogram の分布パターンは癌巢外層において分化度が低下するに従い mode は右方に偏位し、扁平化を示した。また、4℃を越える高倍体細胞の出現は高く、その細胞の割合は特に中分化型に高率に認められた。

稿を終えるに臨み、本研究のご指導とご校閲を賜った恩師内田安信教授に深謝いたします。また、直接ご指導を賜った本学病理学第2講座佐々弘教授に心より感謝申し上げます。終始ご教示、ご助言をいただいた本教室北島晴比古講師に深甚の謝意を表します。さらに本研究にご協力いただいた本教室ならびに病理学教室の諸兄姉に感謝の意を表します。

本論文の一部は第28回日本口腔外科学会総会（昭和58年9月29日）、第73回日本病理学会総会（昭和59年4月4日）において発表した。

引用文献

- 1) 濱島義博, 藤田哲也, 他: 組織細胞化学の最新技術. 日本組織細胞学会, 京都, 1977, 27-54頁.
- 2) Fujita, S. and Fukuda, M.: Irradiation of specimens by excitation light before and after staining with pararosaniline feulgen: A new method to reduce non-specific fluorescence in cytofluorometry. *Histochemistry* 40: 59-67 1974.
- 3) 中村文武: 子宮頸部各種病変における核 DNA 定量に関する研究. *東医大誌* 31: 997-1025 1973.
- 4) 小野為則: 扁平上皮癌の組織構築について. *日口外誌* 13: 385-387 1967.
- 5) Fukuda, M., Okamura, K., et al.: The diffe-

- rent stem cell populations in mouse epidermis and lingual epithelium. *Path Res Pract* 163: 205-227 1978.
- 6) 笹井陽一郎: 組織化学的にみた表皮核 DNA の動態. *日皮会誌* 85: 747-755 1975.
- 7) Leuchtenberger, C.: Critical evaluation of feulgen microspectrophotometry for estimating amount of DNA in cell nuclei. *Science* 120: 1022-1023 1954.
- 8) 渡辺是久: 多形性腺腫の腫瘍細胞核定量による診断学的研究——特に、組織パターンおよび臨床的悪性度と核 DNA 量との相関について——. *歯基礎誌* 24: 466-495 1982.
- 9) 小川和朗, 武内忠男, 他: 新組織化学, 第1版, 朝倉書店, 東京, 1975, 469-500頁.
- 10) 井上勝一, 宮本 宏, 他: ヒト癌細胞の核 DNA の測定——顕微分光測光法と Flow cytometry の比較を中心として——. *日臨細誌* 21: 1-7 1982.
- 11) 野口 允: 表皮細胞の分化に伴う核ヒストン塩基度および DNA 量の変動. *弘前医学* 34: 48-58 1982.
- 12) Gimenez, I. and Carranza, F.A. Jr.: Microspectrophotometric study of DNA in gingival epithelium. *J Dent Res* 52: 1345 1973.
- 13) 北島晴比古: 舌病変における細胞核 DNA 量の研究, 舌癌を中心として. *日口外誌* 26: 583-600 1980.
- 14) 久野吉雄, 道 健一, 他: 今日の歯科医療, 口腔外科的疾患治療の指針. 第1版, 書林, 東京, 1983, 221-256頁.
- 15) 高木 実, 石川梧朗: 乳頭腫. *耳喉* 49: 721-729 1977.
- 16) Shklar, G.: The precancerous oral lesion. *OS OM OP* 20: 58-70 1965.
- 17) Gorlin, R.J. and Goldman, H.M.: *Thoma's Oral Pathology* 6th Ed, Mosby, St Louis, 1970, p 801-803.
- 18) Greer, R.O. and Goldman, H.M.: Oral papillomas. *Oral Surg* 38: 435-440 1974.
- 19) Abbey, L.M., Page, D.G., et al.: The clinical and histopathologic features of a series of 464 oral squamous cell papillomas. *Oral Surg* 49: 419-428 1980.
- 20) Macdonald, D.G. and Rennie, J.S.: Oral epithelial atypia in denture induced hyperplasia, lichen planus and squamous cell papilloma. *Int J Oral Surg* 4: 40-45 1975.
- 21) WHO Collob. Cent.: Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg* 46: 518-539 1978.
- 22) 天笠光雄, 道 健一, 他: 口腔白板症の臨床分類について. *日口外誌* 23: 89-96 1977.
- 23) Chierici, G., Silverman, S. Jr., et al.: A tumor registry study of oral squamous carcinoma. *J*

- Oral medicine 23: 91-98 1968.
- 24) Silverma, S. Jr., Gorsky, M., et al.: Oral leukoplakia and malignant transformation A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 53: 563-568 1984.
 - 25) 天笠光雄, 増尾勝己, 他: 口腔白板症の臨床的病理組織学的研究——特に臨床型と病理組織学的所見との関連について——, *口病誌* 46: 30-42 1979.
 - 26) Banoczy, J. and Csiba, A.: Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg* 42: 766-774 1976.
 - 27) Mehta, F.S., Daftary, D.K., et al.: Clinical and histologic study of oral leukoplakia in relation to habits. *OM OS OP* 28: 372-388 1969.
 - 28) Silverman, S. Jr., Bhargava, K., et al.: Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57, 518 industrial workers of gujarat, INDIA. *Cancer* 38: 1790-1795 1976.
 - 29) Saku, T. and Sato, E.: Prediction of malignant change in oral precancerous lesions by DNA cytofluorometry. *J Oral Pathol* 12: 90-102 1983.
 - 30) 一戸喜兵衛, 福島 務, 他: 産科婦人科学領域における染色体学的研究——腫瘍の染色体について——, *日産婦誌* 22: 843-852 1970.
 - 31) Kramer, I.R.H.: Carcinoma-in-situ of the oral mucosa. *Int dent J* 23: 94-99 1973.
 - 32) 奴田原裕一: 子宮内膜疾患の細胞核 DNA 量の研究——特に内膜癌とその境界病変について——, *東医大誌* 37: 839-857 1979.
 - 33) 三谷 一: 卵巣腫瘍細胞核 DNA に関する研究. *東医大誌* 40: 99-115 1982.
 - 34) 徳岡潤三: 悪性腫瘍細胞の核内 DNA 量に関する研究. *癌の臨床* 11: 133-141 1965.
 - 35) Boquoi, E., Krebs, S., et al.: Feulgen-DNA-cytophotometry on mammary tumor cells from aspiration biopsy smears. *Acta cytologica* 19: 326-329 1975.
 - 36) 佐々木功典, 荻野哲朗, 他: ヒト胃癌細胞核 DNA 量の測定. *日臨細誌* 21: 687-692 1982.
 - 37) Zetterberg, A. and Esposti, P.L.: Cytophotometric DNA-analysis of a spirated cells from prostatic carcinoma. *Acta cytologica* 20: 46-57 1976.
 - 38) Fossa, S.D.: Feulgen-DNA-values in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Beitr Path Bd* 155: 44-55 1975.
 - 39) 小中千守: 乳腺腫瘍細胞の核 DNA 定量による診断学的研究. *日臨細誌* 18: 127-139 1979.
 - 40) 高橋秀禎: 乳腺腫瘍の塗抹細胞における核 DNA 量の検討. *日臨細誌* 19: 52-63 1980.
 - 41) Sugimachi, K., Ide, H., et al.: Cytophotometric DNA analysis of mucosal and submucosal carcinoma of the esophagus. *Cancer* 53: 2683-2687 1984.
 - 42) 遠藤ユリ: 上顎ガン細胞核内 DNA 量の研究——放射線増感剤と照射による DNA 量の変動——, *耳展* 20: 655-676 1977.
 - 43) Wahi, P.N., Cohen, B., et al.: Histological typing of oral and oropharyngeal tumors. World health organization. Geneva, 1971, p 15-27.
 - 44) 佐々木 攻, 亀川隆久, 他: 細胞核 DNA 量分布パターン分析による小粘膜胃癌の悪性度判定に関する研究. *癌の臨床* 28: 23-26 1982.
 - 45) Gimenez, I.B. and Conti, C.J.: Microspectrophotometric determination of DNA in oral lesions. *J Oral Surg* 35: 465-468 1977.
 - 46) Holm, L.E., Jakobsson, P., et al.: DNA and its synthesis in individual tumor cells from human upper respiratory tract squamous cell carcinomas. *The laryngoscope* 90: 1209-1224 1980.
 - 47) Pfitzer, P. and Pape, H.D.: Investigation of DNA-content of leukoplakia cells of oral mucosa. *J max-fac Surg* 3: 119-124 1975.
 - 48) Doyle, J.L. and Manhold, J.H. Jr.: Feulgen microspectrophotometry of oral cancer and leukoplakia. *J Dent Res* 54: 1196-1199 1975.
 - 49) Jakobsson, P.A., Killander, P.D., et al.: DNA content of individual cells from squamous cell carcinomas of the larynx and tongue. *The laryngoscope* 85: 1701-1706 1975.
 - 50) 朔 敬: 舌扁平上皮癌の予後因子の検討. *日口外誌* 26: 279-294 1980.
 - 51) 下里常弘, 北川純一: 口腔領域剝離細胞の顕微分光学的研究. 第1篇, 正常頬粘膜細胞と腫瘍細胞の比較について. *日口外誌* 17: 276-280 1971.
 - 52) 木下勲彦, 志村介三, 他: 口腔病変の臨床的悪性度の指標について. 第1報, 口腔扁平上皮癌ならびに前癌性病変の核量と核面積を中心にして. *日口外誌* 30: 240-256 1984.
 - 53) 三次正春: 多変量データ解析法を用いた口腔領域悪性腫瘍の細胞解析. *日口外誌* 30: 798-817 1984.
 - 54) 吉田俊秀: 癌の発生, 増殖と染色体. *日本臨床* 19: 2273-2284 1961.
 - 55) 牧野佐二郎: 染色体——人類の細胞遺伝. 第1版, 医学書院, 東京, 1979, 125-136頁.
 - 56) Atkin, N.B. and Richards, B.M.: Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of feulgen stain: A comparison of tumors arising at different sites. *Br J Cancer* 10: 769-786 1956.