口腔扁平上皮癌における核 DNA-RNA 量 の解析とその臨床的意義に関する研究

水谷 成孝

An analysis of the nuclear DNA-RNA contents of oral squamous cell carcinoma and its clinical significance

Naritaka MIZUTANI

Abstract: In this study, the author has analyzed cell population kinetics in oral squamous cell carcinoma from the distribution patterns of nuclear DNA and RNA contents in the lesion and pursued the relationship of the result with the clinicopathological findings and the effects of radiation and chemotherapeutic agents. The number of subject cases was 48 and the determination of nuclear DNA and RNA contents was made using DNA-RNA cytofluorometry with acridine orange fluorescence stain. The author found the following:

1) DNA-RNA scattergrams (cytograms) made for the initial medical examination were divided into 4 types: type I had many cells with low RNA contents (that is, G₀ phase); type II had many cells going into cell cycle and had some cell populations belonging to different cell cycles; type III increased RNA content along with an increase in DNA content. The presence of a single cell population was also estimated; type IV, cell groups with abnormally high RNA contents in the 2C DNA range were seen in addition to the presence of the distribution seen and described in type III.

2) The clinical effect of external irradiation or the administration of Peplomycin was observed mainly in type III followed by type IV. The cases with poor effect were seen often in type I. The cases in type II showed variance in the clinical effect.

3) In the cytograms made during the treatment, type I showed a relative abundance of cells at the G₀ phase even after the treatment. Type III and IV showed an early decrease in the cells at the G₀ phase and an increase in the cells with high contents of both DNA and RNA, that is, those at the G₂M phase or abortive mitotic cells. On the other hand, the cases with high clinical effects among type II underwent changes similar to those of type III and IV, and the cases with low effects tended to show no change in the cytogram even after the treatment or accumulation of the cells at the G₀ phase.

Thus, it was found that analysis of nuclear DNA and RNA contents in oral squamous cell carcinoma could clarify presence of the cells at the G₀ phase and some cell populations belonging to other cell cycles. In addition, analysis made it possible to determine cell population kinetics and was useful as an objective index for clinical sensitivity and evaluation.

Key words: oral squamous cell carcinoma, nuclear DNA-RNA contents, cell population kinetics

神奈川県大学口腔外科学教室

(主任: 志村介三教授)

Department of Oral Surgery, Kanagawa Dental

College (Chief: Prof. Kaizo Shimura)

受付日: 昭和62年1月22日

緒 言

口腔癌の治療成績は手術、放射線、化学療法に進歩とそれらの併用療法の発展、普及により向上しつつある。しかし、咀嚼、嚥下、発音などの機能障害を最小限にとどめ、かつ可及的に形態保存が要求される顎、口腔領域では、放射線、化学療法の存在は大きく、術前にいかに病巣を減じ、その限界を見極めるかは以後の治療方針や予後とも関連し重要である。

一方、口腔癌はその組織由来が同じでも生物学的性状は多彩であり、放射線、化学療法に対する反応性も個々の症例によりかなり隔たりがみられる。したがって、治療による副作用を回避し、十分な効果をあげるには症例ごとの治療効果、感受性を速やかにかつ的確に把握し、症例に応じた治療法の選択が求められる。この点に関して、従来より臨床型や組織所見などの面からの追求はなされているが、これらの所見と治療効果とが一致しないことが多く、より客観的な判断基準の確立が望まれている。ことに、放射線や多くの抗癌剤は cell cycle 依存性であり¹⁻³⁾、その効果、感受性の把握には細胞増殖動態の解析が重要な役割をもつが、本領域での報告はきわめて少ない。本教室では、木下ら⁴⁾、藤原⁵⁾らが細胞増殖の中心的な役割を果たす核 DNA の細胞化学的定量解析を行い、口腔癌の細胞生物学的性状の一端を明らかにしている。

今回、著者は口腔扁平上皮癌において、G₁ 期から G₂ 期まで合成を続け細胞増殖に重要な役割を果たす RNA 量⁶⁾を核 DNA 量とともに同時測光を行って本疾患の細胞動態の二次元的解析を試み、これらの所見と臨床病理像や、放射線、化学療法の効果、感受性との関連性を追求したので報告する。

研 究 方 法

1. 検索対象

検索した症例は 1982 年 7 月から 1986 年 7 月までに神奈川歯科大学口腔外科を受診し、治療を行った口腔扁平上皮癌の新鮮例 48 例（ただし、口腔症状を呈した洞性病を含む）であり、対照として健康人歯肉上皮 6 例を用いた。原発部位は舌 14 例、歯肉 14 例、口底 8 例、上顎洞 6 例、頬粘膜 4 例、口蓋 2 例である。これらの臨床的進展度（1978 年 UICC 案⁷⁾、1977 年上顎洞癌 JJC 案⁸⁾）は、T₁ が 4 例、T₂ が 25 例、T₃ が 14 例、T₄ が 5 例であり、N₀ が 26 例、N₁ が 20 例、N₂ が 1 例、N₃ が 1 例で、全例 M₀ である。また組織学的悪性度（1971 年 WHO の分類基準⁹⁾）は、Grade I が 26 例、Grade II が 20 例、Grade III が 2 例である（表 1）。

治療方法は原発巣に対しては、根治療法として手術ま

たは Ra 針組織内照射を行ったが、3 例は T₄ または一般状態不良のために ⁶⁰Co 外部照射および化学療法にとどめた。また、前治療として 9 例に ⁶⁰Co 外部照射、5 例に Peplomycin（以下 PEP）静注を、22 例に ⁶⁰Co 外部照射と PEP 併用を、3 例に ⁶⁰Co 外部照射と 5-Fluorouracil（以下 5-FU）併用を、2 例に ⁶⁰Co 外部照射と PEP に次いで 5-FU の併用を行った。

⁶⁰Co 外部照射は 1.5~2.0 Gy×5/週、総量 12.0~45.0 Gy を、PEP は 2.5~5.0 mg/回を連日または隔日に、総量 7.5~55.0 mg を静注、また 5-FU は 250 mg/回を ⁶⁰Co 外部照射直前に浅側頭動脈から one shot で動注し、総量 5,000~8,750 mg を投与した。

頸部リンパ節に対しては 11 例に頸部郭清術を施行した。

2. 検索方法

1) 核 DNA, RNA 量の測定

a) 単離細胞塗抹標本の作製

初診時生検材料と手術時切除材料では切除片を半割したのち、一方を光顕用標本に供し、他方を P.B.S. (−) 中で 1 mm 角以下に細切後、注射針によるパンピングと 500 kw, 25 kc, 5 分間の超音波処理により細胞を単離し、オートスミア（自動細胞収集装置：サクラ精機）を用い各症例 5~6 枚ずつ無蛍光スライドガラスに塗抹した。次いでその 1~2 枚をアルコール・エーテル固定後、ババニコロウ染色を施し、腫瘍細胞の確認に供し、残りを核 DNA, RNA 量の定量のため 4°C, 70% エタノール固定後、アクリジン、オレンジ（以下 AO）染色を施した。また治療過程における核 DNA, RNA 量の検索には、同一部位から擦過により細胞採取後、無蛍光スライドガラスに塗抹するか、上記と同様の方法で細胞単離を行い塗抹標本とし固定、染色を行った。

b) AO 染色法

染色は Darzynkiewicz ら¹⁰⁾の方法を顕微蛍光測光法用に改良した芦原ら¹¹⁻¹³⁾の AO 染色法により行った。すなわち、前処理液（0.1% Triton X-100, 0.08N HCl, 0.15N NaCl, 10⁻⁴M EDTA）で 4°C, 5 分間の処理を行い、次いで染色液（0.15N NaCl, 10⁻⁴M EDTA, AO: Merk 社製 4 μg/ml, 0.1M McIlvaine Buffer pH 6.0）にて冷暗所（4°C）1 時間染色した。次いで標本上に染色液を 1~2 滴、滴下しカバーガラスをかぶせ、その周囲を透明なマニキュアで封入した。

c) 顕微蛍光多重測光法とデーター解析

核 DNA, RNA 量の測定には顕微蛍光測光装置 SPM-RFI (Nikon) を用い、B 励起（主波長 435~480 nm）、ダイクロイックミラー 490 nm、光電子増倍管電圧 (HV) 400 V、励起光量 (Ex) 82.0 に設定し、吸収フィルターとして DNA 用に 530±10 nm (Nikon), RNA 用に 620 nm のロングパス (Nikon) を用いた。以上の条件で塗抹標本から 100 個の癌細胞について吸収フィル

表 1 口腔扁平上皮癌症例とその臨床経過

症例 No	年齢	性別	部位	TNM 分類	WHO 分類	前 治 療					根治的療法		経 過	
						⁶⁰ Co (Gy)	PEP (mg)	5-FU (mg)	臨床 効果	組織 効果	手術	Ra 針 組織内照射	観察期間	予後
1	72	男	下G	T2N1M0	II	17	BLM 80		MR	II	○		9 か月	Dc
2	71	男	上G	T3N1M0	I	43.2	35		PR	IV	○		4 年 2 か月	Ao
3	82	女	下G	T3N1M0	II	30	52.5		PR	IV		○	4 年 0 か月	Ao
4	63	女	下G	T2N0M0	II	18	40		MR	III	○		2 年 3 か月	Ao
5*	55	女	T	T2N0M0	I							○ ○	3 年 7 か月	Ao
6	63	男	OF	T4N1M0	I	36	55		PR	IV	○		3 年 2 か月	Ao
7	76	女	下G	T2N1M0	I	32.4	47.5		PR			○	3 年 0 か月	Ao
8*	74	男	P	T3N0M0	I						○		2 年11か月	Ao
9	76	女	上G	T2N0M0	I	25.5	27.5		MR	II b	○		3 年 0 か月	Ao
10	83	女	下G	T2N0M0	II	21.4			MR			○	6 か月	Dc
11	55	男	T	T2N1M0	II	12	30		PR				2 年 9 か月	Ao
12	52	男	T	T3N1M0	II	24	45		PR		○	○	2 年 8 か月	Ao
13	84	女	T	T4N2M0	II	22.5			NC				3 か月	Dc
14	40	女	S	T3N0M0	III	25.5		8750	PR	IV	○		2 年 7 か月	Ao
15*	56	男	T	T1N0M0	I		40					○	2 年 9 か月	Ao
16	40	男	OF	T2N1M0	I		12.5		PR		○	○	2 年 8 か月	Ao
17	73	女	BM	T4N1M0	I	42	35	6400	MR			○	9 か月	Dc
18	86	男	OF	T2N1M0	I	12.6			MR			○	2 年 4 か月	Ao
19	70	女	BM	T2N0M0	I	18			PR			○	2 年 4 か月	Ao
20	72	女	BM	T3N0M0	II	28.5	52.5		NC			○ ○	2 年 2 か月	Ao
21	63	女	T	T3N3M0	II	25.5	50		CR	IV			1 年11か月	Ao
22	49	男	T	T3N1M0	II	21.6	55		MR		○	○	1 年10か月	Ao
23	60	女	下G	N2N0M0	I		20		NC	II a	○		1 年10か月	Ao
24*	50	女	T	T2N0M0	I							○	1 年10か月	Ao
25	75	女	T	T2N0M0	I	30.6			PR			○	1 年 9 か月	Ao
26	53	男	S	T3N0M0	II	40.8	80		MR	II b	○		2 年10か月	Ao
27	74	男	下G	T2N1M0	I	30			PR			○	1 年 8 か月	Ao
28*	58	男	T	T2N1M0	II							○	8 か月	Dc
29	58	男	OF	T2N1M0	III	25.2	40		MR		○	○	1 年 6 か月	Ao
30	64	男	S	T3N0M0	II	28.8	30	6750	PR	IV	○		1 年 3 か月	Dc
31	59	女	S	T3N0M0	I	33	30	7000	PD	II b	○		1 年 1 か月	Dc
32	64	男	T	T2N1M0	I	24	57.5		MR		○	○	2 年 0 か月	Ao
33	75	女	T	T1N0M0	II		40		PR			○	1 年10か月	Ao
34	64	男	OF	T2N1M0	II	29.5			PR			○	1 年 5 か月	Ao
35*	78	男	T	T2N0M0	I							○	1 年 3 か月	Ao
36	59	男	BM	T3N1M0	I	28.5	7.5		MR			○	1 年 3 か月	Ao
37	67	女	P	T2N0M0	II		30		MR	II a	○		1 年 3 か月	Ao
38	61	女	T	T2N0M0	II		35		MR	II b	○	○	1 年 0 か月	Ao
39	46	男	OF	T2N1M0	II	30.6	50		PR	II b	○		11か月	Ao
40	81	女	上G	T1N0M0	I	25.8			NC	0	○		11か月	Ao
41	45	男	OF	T1N1M0	II	19.8	30		PR	II b	○		10か月	Ao
42*	62	女	下G	T2N0M0	I						○		11か月	Ao
43	76	男	S	T3N0M0	II	45		5000	NC	II b	○		9 か月	Ao

表 1 つづき

症例 No	年齢	性別	部位	TNM 分類	WHO 分類	前 治 療					根治的療法		経 過	
						⁶⁰ CO (Gy)	PEP (mg)	5-FU (mg)	臨床 効果	組織 効果	手術	Ra 針 組織内照射	観察期間	予後
44	51	男	OF	T2N0M0	I	24	55		PR	Ⅱ b	○		9 か月	Ao
45	63	女	S	T3N0M0	I	22.5	55		PR	Ⅳ	○		9 か月	Ao
46	57	女	下 G	T4N0M0	I	27	32.5		PR	Ⅱ b	○		8 か月	Ao
47	66	女	下 G	T4N1M0	I	27	22.5		PR	Ⅱ b	○		8 か月	Ao
48	89	男	下 G	T2N0M0	I	20			NC	I	○		8 か月	Ax

*：初診時のみ検索

下 G：下顎歯肉，上 G：上顎歯肉，T：舌，OF：口底，P：口蓋，S：上顎洞，BM：頬粘膜
BLM：ブレオマイシン，Ao：生存，Ax：不明，Dc：腫瘍死

ターを交換しながら個々の細胞の核 DNA，RNA の蛍光量を同時測光した。なお核 DNA 量の測光時には細胞質ケラチンの蛍光カブリを避けるために 2 つの測光しぼりにより細胞質をマスクした。

測定値は本体に接続した PANAFACOM C-180 A パーソナル コンピューターにより統計処理し核 DNA 量ヒストグラム，核 DNA-RNA 量サイトグラム（以下サイトグラム）を作製した。なお，腫瘍細胞の核 DNA 量は同一標本上の末梢血リンパ球 20～30 個の核 DNA の蛍光量の平均値を 2 C として算出し，RNA 量は実測蛍光量として求めた。健常人歯肉上皮についても同様の測定および処理を行った。

2) 臨床ならびに組織効果の判定

前治療としての放射線，化学療法の臨床的效果の判定は腫瘍の長径，短径の積から縮小率を求め，日本頭頸部腫瘍学会編頭頸部がん治療効果判定基準¹⁴⁾に準じたが，判定時期は前治療終了時とし，すべての病変が消失したものを CR（著効），縮小率 50% 以上のものを PR（有効），縮小率が 25% 以上 50% 未満のものを MR（微効），25% 未満の縮小から 25% 未満の増大を示したものを NC（不変），測定可能病変が 25% 以上の増大または新病変の出現があるものを PD（進行）とした。

組織学的治療効果の判定は前治療終了時の生検材料または手術材料から得られた 4 μ のパラフィン切片 H-E 染色標本により，大星，下里分類¹⁵⁾に準じ，Grade 0（治療効果を認めないもの），Grade I（細胞障害は認められるが癌巣パターン破壊は認められない），Grade II a（細胞障害，癌巣パターン破壊が認められ，再増殖の可能性の強い癌細胞が広い範囲に存在する），Grade II b（細胞障害，癌巣パターン破壊が認められ，再増殖の可能性の強い癌細胞が小範囲に認められる），Grade III（Non-Viable と思われる癌細胞のみが認められる），Grade IV（癌細胞はまったく認められない）とした。

研 究 結 果

1. AO 染色による核 DNA 蛍光と RNA 蛍光について

AO 染色により核はオルソクロマチックな緑色蛍光を，細胞質はメタクロマチックなオレンジ色蛍光を呈し（写真 1），それぞれの吸収フィルターにより核 DNA と RNA の蛍光が分別された（写真 2）。これらの蛍光は DNAase あるいは RNAase により，それぞれ 80%，90% が消化された。

次に，ヒトケラチン（東京化成）を無蛍光スライドガラス上で AO 染色し，連続干渉フィルターにて蛍光スペクトルを分析すると，490～500 nm にピークをもつが，DNA の蛍光波長のピーク 530 nm にて重なりが認められた。

そこで測定波長 530 nm にて，リンパ球の核 DNA の蛍光量を基準とし，健常人歯肉上皮細胞の細胞質をマスクしない場合の蛍光量と測光しぼりにより十分に細胞質をマスクした場合の蛍光量を測定，比較すると，前者ではリンパ球の核 DNA 量の約 20% の増加を示し，後者ではその増加分は 5% 以下であった。すなわち，扁平上皮細胞の細胞質を十分マスクし，蛍光測光することにより，ケラチン蛍光のかぶりは著しく減少した（表 2）。

2. 健常人歯肉上皮細胞の核 DNA 量，RNA 量

健常人歯肉上皮細胞の核 DNA 量ヒストグラムは 2 C 域に高いピークをもつ単峰型を呈し，4 C 以上の高倍体細胞は認められなかった。

サイトグラムでは，DNA 量 2 C 域に RNA 量が広く分散した分布を示したが，60～70% の細胞は RNA 量が 15～20 以下にあり，残りの細胞はそれよりも高い RNA 量域に散在性に認められた（図 1）。

3. 口腔扁平上皮癌の初診時核 DNA 量，RNA 量所見

1) 核 DNA 量ヒストグラム所見について

写真 1 アクリジン オレンジ染色所見
(B 励起による)

写真 2

左: 530 nm のフィルターによる核 DNA 蛍光
右: 620 nm のフィルターによる RNA 蛍光

初診時、口腔扁平上皮癌の核 DNA 量ヒストグラムは異数倍体、4 C 以上の高倍体細胞が種々の程度に出現し、モード値も 2 C 域～3 C 域のものから、不明のものまでさまざまだが、全体の形からピークの低い単峰型 (19例)、2 峰型 (6 例)、多峰型 (23 例) に類別された。

2) 核 DNA-RNA 量サイトグラム

口腔扁平上皮癌新鮮例 48 例の初診時サイトグラムは症例によりかなり相違が認められるが、核 DNA 量、RNA 量の分布のパターンにより以下の 4 型に大別された。

サイトグラム I 型 (以下 C-I) は、核 DNA 量の変動にもかかわらず、RNA 量の低い細胞群が大半を占めるタイプで、G₀ 期細胞が多く、かつ複数の stemline の存在が推定されるもの。

サイトグラム II 型 (以下 C-II) は、C-I よりも

表 2 測光しぼりの細胞質マスクによる
核 DNA 蛍光量

		蛍光量 (DNA 測光時)	対リンパ 球比
末血リンパ球		4.1±0.1	1.00
健常者歯肉 上皮細胞	非マスク状態	4.9±0.3	1.20
	マスク状態	4.3±0.1	1.05

図 1 健常者歯肉上皮細胞の核 DNA-RNA 量
サイトグラム

RNA 量の分布幅が大きく、各 stemline で細胞回転に入る細胞が比較的多いと考えられるもの。

サイトグラム III 型 (以下 C-III) は、DNA 量が増加するにつれ RNA 量も増加するなど、両者の間に正の相関性がみられ、単一の stemline による細胞増殖が推定されるもの。

サイトグラム IV 型 (以下 C-IV) は、DNA 量と RNA 量の相関性の高い分布のほか、DNA 量に比して異常に高い RNA 量をもつ細胞群がみられるタイプである (図 2)。

それぞれのタイプの頻度は C-I が 6 例、C-II が 20 例、C-III が 15 例、C-IV が 7 例であった。

これらのサイトグラムのタイプと核 DNA 量ヒストグラムパターンとの関係を見ると、C-I では単峰性、多峰性が各 3 例 (各 50%) であり、C-II では多峰性が 14 例 (70%) と最も多く、以下、単峰型が 5 例 (25%)、2 峰型が 1 例 (5%) で、C-III では、単峰型が 8 例 (53.3%) と最も多く以下、多峰型が 4 例 (26.7%)、2 峰型が 3 例 (20%) で、C-IV では単峰型が 3 例 (42.8%)、2 峰型と多峰型が各 2 例 (各 28.6%) であった。

図 2 口腔扁平上皮癌症例の初診時サイトグラム分類

表 3 サイトグラム型とヒストグラム型の関係

ヒストグラム型 \ サイトグラム型	C-I	C-II	C-III	C-IV
単峰型	3 (50)	5 (25)	8 (53.3)	3 (42.8)
2峰型	0 (0)	1 (5)	3 (20)	2 (28.6)
多峰型	3 (50)	14 (70)	4 (26.7)	2 (28.6)
計	6 (100)	20 (100)	15 (100)	7 (100)

(%)

表 4 サイトグラム型とTカテゴリーの関係

Tカテゴリー \ サイトグラム型	C-I	C-II	C-III	C-IV
T1	0 (0)	2 (10)	1 (6.7)	1 (14.3)
T2	3 (50)	11 (55)	6 (40)	5 (71.4)
T3	3 (50)	5 (25)	5 (33.3)	1 (14.3)
T4	0 (0)	2 (10)	3 (20)	0 (0)
計	6 (100)	20 (100)	15 (100)	7 (100)

(%)

(表 3).

3) 核 DNA-RNA 量サイトグラムと臨床進展度の関係

初診時サイトグラムとT分類との関係をみると、C-Iでは、T2、T3が各3例(各50%)、C-IIでは、T1が2例(10%)、T2が11例(55%)、T3が5例(25%)、T4が2例(10%)、C-IIIでは、T1が1例(6.7%)、T2が6例(40%)、T3が5例(33.3%)、T4が3例(20%)、C-IVでは、T1が1例(14.3%)、T2が5例(71.4%)、T3が1例(14.3%)であり腫瘍の大

小、T4が2例(10%)、C-IIIでは、T1が1例(6.7%)、T2が6例(40%)、T3が5例(33.3%)、T4が3例(20%)、C-IVでは、T1が1例(14.3%)、T2が5例(71.4%)、T3が1例(14.3%)であり腫瘍の大

表 5 サイトグラム型とNカテゴリーの関係

サイトグラム型 Nカテゴリー	C-I	C-II	C-III	C-IV
N0	5 (83.3)	8 (40)	7 (46.7)	6 (85.7)
N1	1 (16.7)	11 (55)	7 (46.7)	1 (14.3)
N2	0 (0)	1 (5)	0 (0)	0 (0)
N3	0 (0)	0 (0)	1 (6.6)	0 (0)
計	6 (100)	20 (100)	15 (100)	7 (100)

(%)

表 6 サイトグラム型と WHO 組織学的 Grade の関係

サイトグラム型 Grade	C-I	C-II	C-III	C-IV
I	3 (50)	9 (45)	10 (66.7)	4 (57.1)
II	3 (50)	9 (45)	5 (33.3)	3 (42.9)
III	0 (0)	2 (10)	0 (0)	0 (0)
計	6 (100)	20 (100)	15 (100)	7 (100)

(%)

表 7 サイトグラム型と分化度の関係

サイトグラム型 分化度	C-I	C-II	C-III	C-IV
高	4 (66.7)	13 (65)	14 (93.3)	4 (57.1)
中	2 (33.3)	7 (35)	1 (6.7)	3 (42.9)
低	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	6 (100)	20 (100)	15 (100)	7 (100)

(%)

表 8 サイトグラム型と異型度の関係

サイトグラム型 異型度	C-I	C-II	C-III	C-IV
低	5 (83.3)	9 (45)	11 (73.3)	4 (57.1)
中	1 (16.7)	9 (45)	4 (26.7)	2 (28.6)
高	0 (0)	2 (10)	0 (0)	1 (14.3)
計	6 (100)	20 (100)	15 (100)	7 (100)

(%)

表 9 サイトグラム型と臨床効果の関係

サイトグラム型 臨床効果	C-I	C-II	C-III	C-IV
CR	0 (0)	0 (0)	1 (8.3)	0 (0)
PR	1 (16.7)	8 (50)	6 (50)	5 (71.4)
MR	2 (33.3)	4 (25)	5 (41.7)	2 (28.6)
NC	3 (50)	3 (18.7)	0 (0)	0 (0)
PD	0 (0)	1 (6.3)	0 (0)	0 (0)
計	6 (100)	16 (100)	12 (100)	7 (100)

(%)

表 10 サイトグラム型と組織効果の関係

サイトグラム型 Grade	C-I	C-II	C-III	C-IV
0	0 (0)	1 (12.5)	0 (0)	0 (0)
I	0 (0)	1 (12.5)	0 (0)	0 (0)
II a	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
II b	2 (50)	5 (62.5)	1 (14.3)	1 (33.3)
III	0 (0)	0 (0)	1 (14.3)	1 (33.3)
IV	0 (0)	1 (12.5)	5 (71.4)	1 (33.4)
計	4 (100)	8 (100)	7 (100)	3 (100)

(%)

図3 G₀期, G₂M期あるいは異常分裂細胞の測定範囲

図4 初診時と臨床効果発現時における各期細胞の推移

きとサイトグラムのパターンには明らかな関連性はみられなかった(表4)。

一方、N分類と初診時サイトグラムの関係を見ると、C-Iでは、N0が5例(83.3%)、N1が1例(16.7%)、C-IIでは、N0が8例(40%)、N1が11例(55%)、N2が1例(5%)、C-IIIでは、N0が7例(46.7%)、N1が7例(46.7%)、N3が1例(6.6%)、C-IVでは、N0が6例(85.7%)、N1が1例(14.3%)であり、C-II、C-III症例にN陽性例が多い傾向がみら

れた(表5)。

4) 核 DNA-RNA 量サイトグラムと組織像の関係
サイトグラムとWHO組織学的悪性度との関係では、明らかな相関性はみられなかったが、C-IIIは他のタイプに比べGrade Iの頻度が高く、Grade IIIの2例はいずれもC-IIであった(表6)。

分化度との関係を見ると、C-IIIは高分化型が多い傾向であった(表7)。

また、異型度との関係では、C-IIに異型度が高いも

図 5 症例20 a) 初診時, b) 13日目: ^{60}Co 9 Gy, PEP 17.5 mg, c) 83日目: ^{60}Co 28.5 Gy, PEP 52.5 mg

の多い傾向であった(表8)。

5) 核 DNA-RNA 量サイトグラムと臨床効果の関係
 ^{60}Co 外部照射や PEP, 5-FU による前治療を行った41例の臨床効果と初診時サイトグラムとの関係を見ると, C-I では, PR が1例(16.7%), MR が2例(33.3%), NC が3例(50%)で, 臨床効果の乏しい症例が多く, C-II では, PR が8例(50%), MR が4例(25%), NC が3例(18.7%), PD が1例(6.3%)で, 臨床効果にかなりバラツキがみられた。一方, C-III では, NC, PD はみられず, CR が1例(8.3%), PR が6例(50%), MR が5例(41.7%), また, C-IV では, PR が5例(71.4%), MR が2例(28.6%)であり, これらのタイプは前治療による臨床効果が全般的に高い傾向であった(表9)。

なお, 各サイトグラムにおいて ^{60}Co 照射量, 抗癌剤投与量の差はみられなかった。

6) 核 DNA-RNA 量サイトグラムと組織学的治療効果の関係

^{60}Co 外部照射, 抗癌剤の投与後, 組織学的効果を検索できた症例は22例であった。組織学的効果の内訳は, Grade 0 と Grade I が各1例, Grade II a が2例, Grade II b が9例, Grade III が2例, Grade IV が7例であった。これらと初診時サイトグラムとの関係を見ると, C-I では, Grade II a と Grade II b が各2例(50%), C-II では, Grade 0 と Grade I が各1例(各12.5%), Grade II b が5例(62.5%), Grade IV が1例(12.5%), C-III では, Grade II b と Grade III が各1例(各14.3%), Grade IV が5例(71.4%), C-IV では, Grade II b, Grade III, Grade IV が各1例(各33.3%)であり, C-I, C-II 症例に比べ, C-III, C-IV 症例では, 組織学的にも治療効果が高い傾向が認められた(表10)。

図 6 症例 12 a) 初診時, b) 8 日目: ^{60}Co 6 Gy, PEP 15 mg, c) 42 日目: ^{60}Co 24 Gy, PEP 45 mg

4. 口腔扁平上皮癌の治療過程における核 DNA 量・RNA 量の推移

サイトグラムの推移と臨床効果との関係を初診時サイトグラムのパターン別にみると、初診時 C-I では、臨床効果 PR を示した 1 例 (症例 No. 44) を除き、照射量、抗癌剤投与量に関係なくサイトグラムの変動が少なく、初診時に類似した核 DNA 量、RNA 量の分布を示した。

初診時 C-II では、臨床効果 NC, PD の症例は治療後もサイトグラム上、ほとんど変化がないか (症例 No. 48)、または低 DNA、低 RNA 領域に細胞の蓄積を示した (症例 No. 13, 31, 40)。一方、PR の症例 (症例 No. 11, 12, 14, 27, 34, 39, 41) は治療により、核 DNA 量と RNA 量の相関性が増し、高 DNA、高 RNA 領域の細胞の増加を示した。また、MR 症例は 2 例が NC, PD と、残りの 2 例が PR と同様の変化を示した。

初診時 C-III では、治療後も DNA 量と RNA 量の相関性は高いが、高 DNA 高 RNA 領域の細胞の増加が顕著であった。特に臨床効果 CR の症例はその傾向が大であった。

初診時 C-IV では、C-III と類似した傾向を示した。

これらのサイトグラムにおける細胞分布の変化を Darzynkiewicz の方法¹⁰⁾に従い cell cycle の面から解析し (図 3)、 G_0 期細胞と G_2M 期あるいは異常分裂細胞の量的変化として臨床効果別にまとめると図 4 のごとくである。なお、単一の stemline をもつ C-III, C-IV においては、 G_0 期細胞は RNA 量が低く S 期のそれに直接連続しない細胞群、すなわち、今回の測定条件では、RNA 量が平均 15 以下の細胞とされ、 G_2M 期細胞あるいは異常分裂細胞は 4 C 以上で、RNA 量が G_0 期細胞の上限値の平均 1.7 倍以上の細胞とされた。

また、複数の stemline をもつ C-I, C-II におい

図 7 症例 6 a) 初診時, b) 12日目: PEP 30 mg,
c) 22日目: ^{60}Co 14.4 Gy, PEP 55 mg

では、最も高い DNA 域で回転している stemline の G_0 期の RNA 量を求めると、C-Ⅲ、C-Ⅳの場合と同様に平均 15 以下となり、これ以下の RNA 量をもつ細胞群を全 G_0 期細胞とし、さらに 4 C 以上で G_0 期細胞の RNA 上限値の 1.7 倍以上の細胞を G_2M 期あるいは異常分裂細胞とした。

以上の算出方法により、臨床効果別に G_0 期細胞の変動をみると (図 4), CR, PR 症例では、効果発現時に 19 例が減少、2 例が軽度増加、あるいは不変であった。減少例のうち初診時 G_0 期細胞の頻度の高かった C-I (症例 No. 44), C-II (症例 No. 11) の 2 例は臨床効果発現に伴い、いずれも著しい減少を示した。また、不変ないし増加した症例は初診時 G_0 期細胞の頻度が 8~12% と低く、治療後も同様の範囲内での変動にとどまり、特に C-Ⅲ症例では初診時から低い値を維持した。MR では、減少が 8 例、増加が 5 例であり明らかな傾向

はみられなかった。NC, PD 症例では、ほとんど増減がみられなかった C-I の 1 例 (症例 No. 43) を除いて、ほかはすべて増加し、前治療終了時には約 20% 以上の高い頻度を示した。

一方、 G_2M 期あるいは異常分裂細胞の変動をみると、CR, PR 症例では、増加が 17 例、ほとんど変化がみられないものが 3 例、減少が 1 例であった。このうち、10 例は著明な増加を示したが、そのうち 6 例 (症例 No. 11, 12, 14, 34, 39, 41) が C-II であり、残りは C-Ⅲが 2 例 (症例 No. 2, 6), C-I, C-Ⅳが各 1 例 (症例 No. 44, 16) であった。減少した 1 例 (症例 No. 30) は C-Ⅳで手術後も再燃を繰返し腫瘍死した。MR 症例では増加が 5 例、不変、減少が各 4 例ずつで一定の傾向はみられなかった。また、NC, PD 症例では、C-I と C-II の各 1 例 (症例 No. 20, 48) が軽度増加を示したが、ほかの症例は減少した。しかし、これら症例の初診

時における本細胞群の頻度は、いずれも20%以下と低く、治療後も15%以下の低値を示した。

5. 症例

症例20: 72歳 女性 左頬粘膜癌 T3N0M0 扁平上皮癌 WHO Grade II.

初診時、核 DNA 量ヒストグラムは高2C域にピークをもつ単峰性で、サイトグラムは2~4C域に複数のstemlineをもつI型を示した(図5a)。

PEP 17.5 mg 投与、 ^{60}Co 外部照射 9.0 Gy 後、ヒストグラムのピークは3C域へ移動した。サイトグラムでは、2C域と4C域の低RNA細胞の減少がみられた(図5b)。

その後、PEP 52.5 mg、外部照射 28.5 Gy まで治療を継続したところ、4C以上の高倍体細胞の軽度増加を示したが、サイトグラムでは3C域の低RNA細胞が残存し、臨床的にも治療抵抗性を示した(図5c)。

以後、Ra 針組織内照射を行い、臨床および組織学的に腫瘍は一時制御されたかにみえたが、1年3か月後に再発をきたした。

症例12: 52歳 男性 舌癌 T3N1M0 扁平上皮癌 WHO Grade II.

初診時、核 DNA 量ヒストグラムは2~4C域に3つのピークをもつ多峰性を呈し、サイトグラムでは2~4C域に複数のstemlineをもつII型を示した(図6a)。

PEP 15 mg 投与、 ^{60}Co 6.0 Gy 照射後、ヒストグラムでは5C以上の高倍体細胞の増加がみられた。サイトグラムでは、3、4C域をstemlineとする細胞群の G_0 期細胞が減少し、それに対応する G_2M 期細胞が増加した(図6b)。臨床的にも腫瘍は縮小傾向を示した。

PEP 45 mg、外部照射 24 Gy の時点では、ヒストグラムは高倍体細胞の著明な増加を示したが、サイトグラムでは、 G_2M 期あるいは異常分裂細胞がさらに増加するとともに、2C域のstemlineにおける G_0 期細胞の減少がみられ、相関性の高いサイトグラムに変化した(図6c)。臨床的にも腫瘍の縮小が顕著となり、臨床効果PRと判定された。

その後、Ra 針組織内照射、次いで頸部郭清を行い、2年9か月後の現在、再発と転移がなく、経過良好である。

症例6: 63歳 男性 舌癌 T4N0M0 扁平上皮癌 WHO Grade I.

初診時、核 DNA 量ヒストグラムは3C、4C域にピークをもつ2峰型、サイトグラムはII型を示した(図7a)。

PEP 計 30 mg 静注後、ヒストグラムでは右方化と分散の増大がみられ、サイトグラムでは G_2M 期細胞あるいは異常分裂細胞の著しい増加が認められ(図7b)、腫瘍は縮小の傾向を示すようになった。

その後、 ^{60}Co 外部照射を併用し、PEP 計 55 mg、外

部照射 14.4 Gy でヒストグラムは扁平化、多峰化を示したが、サイトグラムでは、 G_2M 期あるいは異常分裂細胞の増加とともに、 G_0 期細胞の相対的な減少が認められた(図7c)。

PEP 計 55 mg、外部照射計 36 Gy で臨床効果PRと判定され、次いで1か月後、根治的手術を行ったが、組織学的効果はGrade IVであり、3年後の現在、再発と転移がなく、経過順調である。

考 察

1. 顕微蛍光多重測光法について

1936年 Caspersen¹⁸⁾ が紫外線顕微鏡下で核酸を定量して顕微測光法の基を築いて以来、測光装置ならびに染色法の開発、進歩^{19, 17-19)}とあいまって、今日では本法は病変の細胞レベルでの細胞内物質の定量、解析に欠くことのできない研究方法となっている。ことに、腫瘍性病変の生物学的性状の細胞化学的検査において核DNAは細胞の増殖や遺伝情報の伝達に中心的役割を果たす生体物質として注目され、当初より主要な検察対象とされてきた^{18, 20-25)}。

すなわち、1954年 Leuchtenberger ら²⁴⁾ が顕微分光測光法により、正常組織の核DNA量は恒常性があり、細胞分裂に伴い合成、倍加するが、悪性腫瘍の核DNA量分布は規則性を失い、正常から大きく逸脱することを報告した。以来、多くの研究者により種々の腫瘍における核DNA量の検索がなされ、これと臨床、病理学的悪性度や予後との関連性が種々論議されている^{4, 5, 20-22, 25-28)}。

また、近年、癌の集学的治療として放射線、化学療法は重要な位置を占めているが、それらの作用機序、あるいは治療効果と細胞増殖動態との関連性について核DNA量分布パターンによる解析が試みられている^{29, 30)}。しかし、これを実際の臨床例に応用する場合、核DNA量だけでは G_0 期と G_1 期の識別、すなわち非増殖相の解析が全く不可能であること、複数のstemlineの存在下ではcell phaseの同定が困難であることなど問題があり、他の細胞内物質も加えた多角的な細胞動態の解析法が求められている³¹⁻³³⁾。

著者はこのような観点から核DNAとともに細胞増殖に密接に関係しているRNAに着目し、口腔扁平上皮癌細胞の核DNA量、RNA量の同時測光により、細胞動態の二次元的解析を試みた。

すなわち、今回の核DNA量とRNA量の同時測光は芦原ら¹¹⁻¹³⁾の方法に従いAO染色を施し、落射型蛍光顕微鏡を用いたが、本法は、従来の透過型蛍光顕微鏡による測光に比べ、バックグラウンドの蛍光量を減少させるなど、高い精度が得られ¹⁹⁾、またFlow Cytometryに比べて能率は低いが、目的とする腫瘍細胞のみの測定が可能であるなどの利点がある³⁴⁾。

AO 染色による核 DNA, RNA 量の同時測光の原理は, AO 分子が EDTA 処理³⁵⁾によって単鎖となった RNA と 2 重鎖の DNA とでは結合力を異にし, この結合力の差が蛍光の量と質の差となり, すなわち DNA との結合により緑色の蛍光を, RNA との結合により赤色蛍光を発することを利用している^{11,36)}.

本染色による核 DNA, RNA 量の顕微蛍光測光による定量性については, 蒲池ら¹¹⁾によって染色後 1 週間は染色性が安定しており, 測光中に定量性が損われないことが確かめられているが, 著者は染色後, ただちに測光を行った.

また, 本法による口腔扁平上皮細胞の核 DNA, RNA 染色の特異性について DNAase と RNAase による消化試験で検討した結果, DNA, RNA 量の消化率はそれぞれ 80%, 90% で, DNA 量の消化率がやや劣っていた. これは過剰の陽イオンの存在下でも AO との結合が阻害されない角化細胞のケラチンによる蛍光かぶりに起因すると考えられる³⁷⁾ そこで DNA 量測光時に 2 つの測光絞りで細胞質を十分マスクしたところ, ケラチン蛍光のかぶりは 5% 以下に減少し, これにより, 本染色法を用いた核 DNA, RNA 量の測定は, 口腔扁平上皮癌において十分可能と考えられた.

2. 健常者歯肉上皮細胞の核 DNA・RNA 量について

一般に正常組織の核 DNA 量ヒストグラムでは大部分の細胞が diploid, すなわち 2C に分布し, 少数の細胞が 2~4C 間と 4C, すなわち S 期 (DNA 合成期) と G₂ 期 (分裂準備期), M 期 (分裂期) の細胞として認められる^{4,38)}. 今回検索した健常者歯肉上皮細胞の核 DNA 量分布も基本的に従来の報告と同一の所見を示した. しかし正常細胞の大部分を占める 2C 域の細胞群には G₀ 期 (非増殖期³⁹⁾、G₁ 期 (DNA 合成準備期) として, G_{1D} 期 (もはや細胞回転に入らない分化, 成熟した細胞群^{40,41)}) により構成されると考えられるが, それらの区別, 割合など詳細についてはほとんど知られていない. 最近, Darzynkiewicz ら^{10,37,42)}、芦原¹³⁾、蒲池⁴³⁾によって核 DNA 量と RNA 量の量的関係から, 細胞増殖動態を解析しようとする試みがなされている. 本法は細胞分裂に際し RNA 量が DNA 合成前の G₁ 期から増加し, G₂ 期まで合成されるという事実⁴⁾に基づいたもので, 従来の核 DNA 量分布だけでは把握し難い細胞増殖動態, 特に非増殖細胞群と増殖細胞群の解析を可能とした. すなわち, いまだ RNA が合成されない G₀ 期細胞は低い RNA 量域に分布する¹⁰⁾のに対し, G₁ 期は DNA 量が同じでも RNA が合成, 増加して 2~4C 間の S 期へ連続する細胞群として認められる. また, 細胞回転における RNA 量は通常 G₂M 期まで合成, 増加するが, 多くても G₁ 期の 1.7~2 倍を越えることはなく^{10,41,44)}, ときにみられる異常に高い RNA 量の細胞は分化, 成熟し, 細胞回転には入らない G_{1D} 期の細胞と

考えられている^{37,40,41,45)}.

今回の健常者歯肉の核 DNA-RNA 量サイトグラムをみると DNA 量 2C 域の細胞の 60~70% は RNA 蛍光量 20 以下の低い RNA 量域に高密度に分布し, 残りはそれよりも高い RNA 量域に散在性に分布していた. 前者は 2~4C 間の S 期の RNA 量の下限値よりも低く G₀ 期に相当する細胞と考えられる. 一方, 後者の細胞群のうち G₂M 期の RNA 量よりも低い細胞, すなわち RNA 蛍光量がおおよそ 40 以下の細胞は G₁ 期に, またそれ以上の異常に高い RNA 量域の細胞はもはや細胞回転に入らない分化, 成熟した細胞と推定される.

3. 初診時扁平上皮癌の核 DNA・RNA 量所見について

核 DNA 量と RNA 量の同時定量により腫瘍細胞動態を多角的に解析しようとする試みは端緒についたばかりであり, 現在までわずかに蒲池ら^{11,43)}、芦原ら^{12,13)}、山岡ら^{46,47)}、牧山ら⁴⁸⁾、Klein ら⁴⁹⁻⁵¹⁾の報告がみられるにすぎず, 特に口腔領域での報告は皆無である.

今回の口腔扁平上皮癌における核 DNA, RNA 量の検索によれば, そのサイトグラムは多彩であり, その分布状態から 4 型に大別されたが, それらは本症における細胞動態, 生物学的性状の多様性を反映していると思われる. すなわち, I 型は, 核 DNA 量の変動にもかかわらず, RNA 量の低い細胞群が大半を占めるタイプで, 2~4C 間に複数の stemline が存在するが, 全体に G₀ 期細胞が多く, 増殖活性は低いと推測される. II 型は, I 型よりも RNA 量の分布幅が大きいことから, 各 stemline で細胞回転に入る細胞も多く, 増殖活性が高いと考えられる. 一方, III 型は, DNA 量と RNA 量の相関性が強く, リンパ球¹⁰⁾やハムスター卵巣の培養細胞 (CHO)⁴⁴⁾にみられるサイトグラムに類似しており, 単一の増殖群による高い増殖活性が推測される. また, IV 型は, DNA 量と RNA 量の相関性の高い分布のほかに, DNA 量に比して異常に高い RNA 量をもった細胞を含むタイプであり, 一般にこのような細胞は高度に分化し, 細胞回転に入らず死滅していくと考えられる^{37,40,45)}.

これらサイトグラムのタイプと核 DNA 量ヒストグラムパターンとの関係を見ると多峰型では, C-II の頻度が, また単峰型では C-III の頻度が高いが, 個々の症例をみると同型のヒストグラムでもサイトグラムにかなり相違が認められる. このことは, 核 DNA, RNA 量の分布様式は従来の核 DNA 量ヒストグラムだけでは把握し難い口腔扁平上皮癌の多様な細胞動態を呈示しているといえよう.

癌細胞の核酸の分布様式と臨床進展度との関係については, 芦原¹³⁾、蒲池⁴³⁾は顕微蛍光測光による胃癌の核 DNA, RNA 量の検索の結果, 癌の生長, 進行に伴い polyploid 化や stemline の複数化が生じると述べ, また

山岡ら^{46,47)}は、Flow Cytometry を用いた検索により肺癌、大腸癌の進行例では RNA 量の増大傾向がみられ、RNA が増殖活性の指標となると述べている。今回の検索結果では T カテゴリーと核 DNA-RNA 量サイトグラムの間には明らかな関連性はなかった。これは臓器による進展様式の違いや検索部位、方法の相違も関与していると思われる。一般に固形腫瘍の場合、同一腫瘍内でも血行の乏しい中心部では、非増殖相が多く、逆に血行の良い辺縁部では増殖活性が高い⁵²⁻⁵⁴⁾など部位により細胞動態に相違がみられるが、特に後者は個々の症例の癌の悪性度、生物学的性状を評価するうえで重視されている^{39,55,56)}。今回の検索はいずれも腫瘍辺縁部を対象としたものであり、その結果、核 DNA, RNA 量分布に相違がみられたことは口腔扁平上皮癌の増殖活性の多様性を反映しているといえよう。

サイトグラムと頸部リンパ節転移との関係では、C-II, C-III型、すなわち細胞回転に入っている細胞群の多いタイプにN陽性例が多くみられ、リンパ節内での転移巣の形成に細胞増殖活性の高さがある程度の役割を演じていることを示している²⁷⁾。

サイトグラムと組織学的悪性度との関係では、C-IIに分化度の高いものが、また、C-IIに異型度の高いものが多い傾向を示した。しかし、同程度の分化度、異型度を示す症例でも、核 DNA, RNA 量の分布に相違もみられ、これらサイトグラムの所見は組織像だけでは把握し難い個々の症例の細胞動態の違いを呈示していると思われる。

4. 初診時の核 DNA・RNA 量所見と治療効果との関係について

従来より、口腔扁平上皮癌に対する放射線や化学療法感受性の評価は主に腫瘍の発育型や進展度などの臨床像、ならびに分化度、異型度、浸潤様式などの病理組織所見から行われているが⁵⁷⁻⁵⁹⁾、これらは定性や客観性に問題があり、また、実際の臨床経過とが一致しないことも少なくない。

一方、最近の細胞測光法の進歩により、腫瘍細胞の核酸の定量、解析が可能となり、細胞動態の面からの治療感受性に対する定量的、客観的指標が追求されつつある。しかし、この点に関する臨床例での検索はいまだ少なく³⁾、特に核 DNA, RNA 量の二次元的な核酸分布動態と治療効果との関連性についての検索は今まで著者が渉猟した限りでは認められない。

本研究では、低 RNA 細胞、すなわち G₀ 期細胞が多く、複数の stemline を含む C-I 型には放射線外部照射、抗癌剤の臨床効果の乏しい症例が多かった。これは、放射線外部照射や PEP, 5-FU の抗癌剤が増殖相に感受性が高く^{55,56)}、非増殖相にきわめて感受性が低いことに対応している⁶⁰⁻⁶²⁾。

また、C-IIはC-Iに比べ増殖活性が高く、放射線外

部照射や抗癌剤に感受性が高いと予測されたが、実際の効果は PR から PD までバラツキがみられた。これは複数の腫瘍増殖群の間で、治療感受性に差があることを示すものであり、臨床効果の高いものは外部照射や PEP, 5-FU に比較的感受性の高い増殖群が多く、逆に効果の乏しいものでは、それらに感受性の低い細胞群が多く含まれていると思われる。

一方、単一の stemline をもち、増殖活性の高い C-III, および一部の細胞 (RNA 量が異常に高く、細胞回転に入らない細胞) を除き、相対的に増殖相の細胞を多く含む C-IV では、全般に外部照射や PEP, 5-FU によく反応した。しかし、個々の症例をみると照射量、投与量が同程度のもので臨床効果は CR から MR まで差がみられた。これはやはり各増殖群により治療に対する感受性に違いがあるためと思われる。

核 DNA, RNA 量と組織効果との関係では、C-I, C-IIに大星、下里分類 Grade 0 から IIb, すなわちほとんど組織効果がみられないか、再増殖の可能性の高い細胞が残存しやすく、C-III, C-IVに Grade IIIから IV, すなわち non-viable な細胞が残存、ないしは腫瘍細胞の消失するものが多い傾向であった。これらの結果は、ほぼ臨床効果と対応しており、初診時の核 DNA-RNA 量サイトグラムのパターンから外部照射や抗癌剤の感受性、効果の予測も可能であることを示している。

5. 治療過程における核 DNA・RNA量の推移と治療効果との関係について

放射線や多くの抗癌剤は核酸の合成あるいは代謝障害により、最終的に細胞死を招いて、抗癌効果を発揮する^{1-3,29,63,64)}。したがって、これらの治療過程における核酸量の推移は細胞増殖動態を反映するとともに、治療の効果、感受性を評価するうえで有力な情報を提供するものと考えられる。

一方、口腔扁平上皮癌の治療法として現在、放射線外部照射、PEP, 5-FU がしばしば適用されているが、このような観点からの検索は藤原⁵⁾による核 DNA 量と核面積の経時変化の報告がみられるのみである。

一般に放射線の殺細胞効果には間期死と増殖死が知られており^{65,66)}、前者は一度に大線量を照射した場合にみられ、細胞の破壊、死滅により核 DNA 量の減少⁶⁷⁾が認められている。後者は小線量照射、臨床的には分割照射時などにみられ、cell cycle 依存性で G₂ 期ブロックと分裂遅延^{1,64)}により次第に細胞死 (分裂死) に至るものと考えられている。臨床例における核 DNA 量の変化としてはおおそ 20~30 Gy までに 4 C 細胞、すなわち G₂M 期細胞の蓄積と 4 C 以上の高倍体細胞、すなわち異常分裂細胞がみられ⁶²⁾、ことに臨床効果の高いものにはより早期に認められるという⁵⁾。

PEP は BLM の誘導体²⁾で、濃度依存性があり、太

田ら³⁰⁾の *in vitro* での検索によれば低、中濃度では放射線外部照射と同様、G₂M 期の蓄積がみられ、また藤原³¹⁾による臨床例の検索でも同様の結果が得られている。

5-FU は DNA 合成阻害と RNA の機能障害により殺細胞効果を示すと考えられている^{3,63)}。本剤による細胞動態の解析は少ないが、太田ら³⁰⁾の *in vitro* の検索によれば、低濃度では S 期ブロックにより 3 C 域細胞の増加が、また、高濃度では G₁-S 移行期の蓄積がみられている。

今回の口腔扁平上皮癌の治療過程における核 DNA-RNA 量サイトグラムの経時的観察結果では、5-FU の投与例はいずれも放射線との併用であり、サイトグラム上、本剤固有の変化は認められなかった。しかし、放射線照射あるいは PEP 投与におけるサイトグラムの変化の様相、ことに高 DNA 高 RNA 細胞および低 RNA 細胞の推移は初診時のサイトグラムパターンによっても異なるが、これらの治療の効果、感受性との関連において興味ある結果を示していた。すなわち、高 DNA 高 RNA 細胞は、G₂M 期細胞あるいは異常分裂細胞に、また低 RNA 細胞は G₀ 期細胞にはほぼ対応しているが、CR, PR 症例では、そのほとんどが治療早期より G₂M 期細胞あるいは異常分裂細胞の増加と G₀ 期細胞の減少を示した。前者は放射線と PEP の G₂ 期ブロック、分裂障害に基づくものであり^{1,2,29,30,64)}、それら治療の感受性の高さを示している。また、後者の変化は非増殖相にある細胞が何らかの物理的、化学的引金により増殖相に誘導される現象、いわゆる recruitment^{29,61,66,69)}に相当するものと考えられ、このような現象は、これまでも X 線⁷⁰⁾、⁶⁰Co 照射⁷¹⁾、melphalan^{72,73)}、CA⁷⁴⁾、CVC⁷⁵⁾、Adriamycin⁷⁶⁾などの抗癌剤、または腫瘍減量手術⁷⁷⁾によって認められている。

また、PR 症例のうち例外的に効果発現時に G₂M 期あるいは異常分裂細胞の減少と G₀ 期細胞の増加を示した 1 例(症例 No. 30)は、その後の減量手術、放射線、PEP、5-FU 等の化学療法にも抵抗性を示し、最終的に腫瘍死した。一般に、放射線、化学療法後に残存した腫瘍細胞は治療抵抗性で、G₀ 期である可能性が高く⁶⁰⁻⁶²⁾、本症例のごとく臨床的に縮小効果が明らかなものでもこのようなサイトグラムの変化を示すものは、楽観できず、治療法の速やかな転換が必要であろう。

一方、NC, PD 症例では、G₂M 期あるいは異常分裂細胞は初診時より低いものが多く、軽度の増減にとどまったが、G₀ 期細胞は顕著な増加を示すものが多かった。これは、治療感受性のある増殖相の細胞が死滅、消失し、治療感受性の低い非増殖相の細胞が相対的に増加したためと考えられ、組織学的にもこのような症例は再増殖の可能性のある腫瘍細胞が残存する傾向が高く、前治療としての放射線、化学療法の効果はあまり期待でき

ず、外科的処置を重視すべきであろう。

また、MR 症例ではサイトグラムの推移にかなりバラツキがみられ、臨床効果と細胞動態からみた治療効果との相関性が乏しかった。放射線、化学療法による臨床的縮小には腫瘍辺縁および腫瘍組織内の間質の線維化も関与しており^{78,79)}、このような症例では、臨床効果よりもサイトグラムの変化の方がむしろ治療効果、感受性を客観的に反映しているともいえる。

以上、顕微蛍光多重測光法による口腔扁平上皮癌細胞の核 DNA, RNA の同時定量、解析は従来の核 DNA 量ヒストグラムに比べ G₀ 期細胞の識別や複数の stemline の存在確認など、より詳細な細胞動態の把握を可能とし、また、核 DNA-RNA 量サイトグラムの変動様式は治療感受性、効果と密接に関連し、それらの客観的指標として臨床的意義が高いと思われる。

結 論

1982年7月から、1986年7月までに神奈川歯科大学口腔外科を受診し、当科で治療を行った口腔扁平上皮癌の新鮮例48例についての治療前、治療過程における核 DNA, RNA 量の動態解析を行い、これと臨床病理所見および、治療効果との関連性を検討した結果、以下の結論を得た。

1) 核 DNA 量, RNA 量の測定はアクリジン・オレンジ染色を行い、顕微蛍光測光法により行ったが、核 DNA 測光時の細胞質内蛋白(特にケラチン)のかぶりでは、核 DNA 測光時、細胞質を十分にマスクすることで5%以下に減少させることができた。

2) 健常者歯肉上皮細胞の核 DNA-RNA 量サイトグラム(以下サイトグラム)は核 DNA 量 2 C 域に RNA 量が幅広く分散した分布図を示したが、その60~70%は G₀ 期に相当する低 RNA 域に分布した。

3) 初診時、扁平上皮癌のサイトグラムは4型に大別された。すなわち、サイトグラムⅠ型(C-I)として DNA 量の変動にもかかわらず、相対的に RNA 量の低い細胞群、いわゆる G₀ 期相当細胞が多いと考えられるタイプ、サイトグラムⅡ型(C-II)として、C-I に比べ RNA 量の分布幅が大きく細胞回転に入った細胞が比較的多く、かつ、複数の細胞増殖群が推定されるタイプ、サイトグラムⅢ型(C-III)として、DNA 量と RNA 量の相関性が高く単一の stemline による細胞増殖を呈するタイプ、サイトグラムⅣ型(C-IV)として、C-III にみられる DNA, RNA 分布に加え核 DNA 量 2 C 域に高 RNA 量をもった細胞が分布するタイプに分類された。各タイプの頻度は、C-I が6例、C-II が20例、C-III が15例、C-IV が7例であった。

4) 初診時、核 DNA 量ヒストグラムとサイトグラムの関係では、C-II に核 DNA 量ヒストグラム多峰型が

多く、C-Ⅲには単峰型が多い傾向であった。サイトグラムと臨床進展度との関係では、腫瘍の大きさに関連はみられなかったが、C-Ⅱ、C-Ⅲ症例にN陽性例が多かった。組織学的悪性度とサイトグラムの関係では、他のタイプに比べ、C-ⅢにGrade Iが多く、また、C-Ⅲは高分化型が、C-Ⅱは異型性が高いものが多い傾向であった。

5) 放射線照射、PEP投与またはそれらの併用による臨床効果と初診時サイトグラムの関係をみると、C-Ⅲが最も効果が高く、次いでC-Ⅳであった。C-Ⅰ症例では効果の乏しいものが多く、C-Ⅱ症例では効果の高いものと低いものが同数みられた。術前治療終了時の組織効果ではC-Ⅰ、C-Ⅱに大星、下里分類Grade 0~Ⅱbが、C-Ⅲ、C-ⅣにGrade Ⅲ、Ⅳを呈するものが多かった。

6) 治療過程におけるサイトグラムの推移をみると、C-Ⅰは治療後もRNA量の低いG₀期細胞が相対的に多く、治療抵抗性を示した。C-Ⅱの臨床効果の高い症例では、治療初期からG₀期細胞の減少、DNA量、RNA量の高い、いわゆるG₂M期あるいは異常分裂細胞の増加、すなわち相関性の高いサイトグラムに変化し、一方、低い症例では、不変か、G₀期細胞の多いサイトグラムに変化した。C-Ⅲでは、早期にG₀期細胞の減少、G₂M期あるいは異常分裂細胞が増加するものが多く、一部反応の少ない症例にG₀期細胞の残存がみられた。C-ⅣでもC-Ⅲ同様、G₂M期あるいは異常分裂細胞の増加を示すものが多いが、反応の少ない例ではG₀期の多いサイトグラムを示した。

稿を終えるにあたりご懇篤なご指導、ご校閲をいただいた神奈川歯科大学口腔外科学教室志村介三教授に深謝いたします。また、ご教示、ご校閲をいただいた本学病理学教室久田太郎教授、同口腔生化学教室斎藤滋教授に厚く謝意を表します。さらに、本研究に終始ご指導、ご鞭撻をいただいた当教室木下鞆彦助教授、ならびにご援助、ご協力いただいた当教室本間義郎講師、藤原由直博士、および教室の諸先生方に感謝いたします。

本論文の要旨は、第30回日本口腔外科学会総会（昭和60年9月25日）、第20回神奈川歯科大学学会総会（昭和60年12月14日）、第40回日本口腔科学会総会（昭和61年5月16日）、第10回日本頭頸部腫瘍学会（昭和61年6月26日）、第31回日本口腔外科学会総会（昭和61年10月17日）、第25回日本臨床細胞学会秋期大会（昭和61年11月20日）、第21回神奈川歯科大学学会総会（昭和61年12月13日）、第5回口腔腫瘍研究会（昭和62年1月24日）において発表した。

引用文献

- 1) Terasima, T. and Tolmach, L.J.: Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature* 190: 1210-1211 1961.
- 2) 若松佳子：抗癌剤と細胞。紫耀 34: 1013-1018 1986.
- 3) Duschinsky, R., Plevin, E., et al.: The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J Am Chem Soc* 79: 4559-4560 1957.
- 4) 木下鞆彦、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DNA量と核面積を中心にして。日口外誌 30: 240-256 1984.
- 5) 藤原由直：口腔扁平上皮癌の治療過程における核DNA量、核面積の解析と臨床的意義に関する研究。日口外誌 30: 779-797 1984.
- 6) 岡田重文：細胞周期（5）細胞周期の生化学。医学のあゆみ 101: 36-42 1977.
- 7) Harmer, M.H. (edit): TNM classification of malignant tumours. 3rd Ed, UICC, Geneva, 1978, p 23-26.
- 8) 酒井俊一：日本の鼻疾患の現状と将来(その10)上顎癌分類の発展。耳展 23: 437-443 1980.
- 9) Wahi, P.N., Cohen, B., et al.: Histological typing of oral and oropharyngeal tumours. WHO, Geneva, 1971, p 17-18.
- 10) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., et al.: Lymphocyte stimulation. A rapid multiparametric analysis. *Proc Natl Acad Sci* 73: 2881-2884 1976.
- 11) 蒲池正浩、富増寛之、他：DNA・RNA顕微螢光多重測定法のためのアクリジン・オレンジ染色法。医学のあゆみ 127: 1146-1149 1983.
- 12) Ashihara, T., Kamachi, M., et al.: Development of a cytofluorometer for two-parametric analysis and its application to the analysis of rat liver cells. *Eur J Cell Biol* 22: 584 1980.
- 13) 芦原 司：落射型顕微螢光測定法と細胞病理学。京府医大誌 93: 763-780 1984.
- 14) 広戸幾一郎、他編：頭頸部がん治療効果判定基準(案)。日本頭頸部腫瘍学会治療効果判定基準委員会：1-10 1985.
- 15) 石川七郎、編：癌・放射線療法。第1版、医歯薬出版、東京、1969、22-26頁。
- 16) 星野一正：組織細胞化学1981。第1版、学際企画、1981、東京、89-104頁より引用。
- 17) Fujita, S.: DNA cytofluorometry on large and small cell nuclei stained with pararosaniline feulgen. *Histochemie* 36: 193-199 1973.
- 18) Ploem, J.S.: The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. *Zschr Wiss Mikr* 68: 129-142 1967.

- 19) 濱島義博, 藤田哲也, 他編: 組織細胞化学の最新技術. 第1版, 学際企画, 東京, 1977, 27-54頁.
- 20) Atkin, N.B.: Modal DNA value and chromosome number in ovarian neoplasia. *Cancer* 27: 1064-1073 1971.
- 21) Sandritter, W.: DNA Cytophotometry in cellular pathology. *最新医学* 35: 777-781 1980.
- 22) Giménez, I.B., Conti, C.J., et al.: Microspectrophotometric determination of DNA in oral lesions. *J Oral Surg* 35: 465-468 1977.
- 23) Caspersson, T.O.: Quantitative tumor cytochemistry-G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res* 39: 2341-2355 1979.
- 24) Leuchtenberger, C., Leuchtenberger, R., et al.: A microspectrophotometric study of the deoxyribose nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissues. *Am J Pathol* 30: 65-85 1954.
- 25) Sandritter, W., Lobel, B.L., et al.: Photometric cytodiagnosis of vaginal smears. *J Natl Cancer Inst* 32: 1221-1228 1964.
- 26) 広瀬俊太, 岩佐善二: DNA 解析—消化管の境界病変の核 DNA 量についての検討. *癌の臨床* 18: 859-869 1972.
- 27) 本間義郎: 口腔癌の頸部リンパ節転移に関する研究. *日口外誌* 28: 1667-1684 1982.
- 28) 浜田新七: 顕微蛍光 DNA 測光法によるヒト大腸腫瘍の解析. *京府医大誌* 94: 129-148 1985.
- 29) 太田邦夫, 山本 正, 編: 癌の科学 第5巻 癌の制圧—最近の治療学—. 第1版, 南江堂, 東京, 1979, 19-58頁.
- 30) 太田和雄, 高木 滋: 細胞回転と制癌—化学療法の見方から—. *癌の臨床* 27: 1499-1506 1981.
- 31) Fowlkes, B.J., Herman, C.J., et al.: Flow microfluorometric system for screening gynecologic cytology specimens using propidium iodide-fluorescein isothiocyanate. *J Histochem Cytochem* 24: 322-331 1976.
- 32) Crissman, H.A., Darzynkiewicz, Z., et al.: Correlated measurements of DNA, RNA, and protein in individual cells by flow cytometry. *Science* 228: 1321-1324 1985.
- 33) Bunn, P.A., Carmey, D.N., et al.: Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. *Cancer Res* 43: 5026-5032 1983.
- 34) 佐々木功典: 消化器癌の DNA 解析. *最新医学* 40: 85-87 1985.
- 35) Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., et al.: Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. *J Histochem Cytochem* 25: 46-56 1977.
- 36) 小川和朗, 武田忠男, 編: 新組織化学. 第1版, 朝倉書店, 東京, 1975, 469-500頁.
- 37) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., et al.: New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 1: 98-108 1980.
- 38) Fossá, S.D., Kaalhus, O., et al.: The clinical and histopathological significance of feulgen DNA-values in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Eur J Cancer* 13: 1155-1162 1977.
- 39) 井出利憲: 動物細胞の細胞周期—G₀ 期の周辺—. *生化学* 57: 255-295 1985.
- 40) Scott, R.E., Florine, D.L., et al.: Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G₁ phase of the cell cycle: G₀. *Proc Natl Acad Sci* 79: 845-849 1982.
- 41) 楠崎克之, 竹下秀之, 他: 顕微蛍光多重測光法によるラット骨端軟骨細胞の増殖・分化・成熟過程の解析. *整形外科基礎科学* 11: 103-107 1984.
- 42) Darzynkiewicz, Z.: Acridine Orange as a molecular probe in studies of nucleic acids in situ: Flow cytometry and sorting. (ed. by Melamed, M.R., Mullaney, P.F., et al.) 1st Ed, John Wiley & Sons, New York, 1979, p 285-316.
- 43) 蒲池正浩: DNA-RNA 顕微蛍光多重測光法によるヒト胃癌細胞の増殖動態解析—病理形態および癌の生長と関連して—. *京府医大誌* 93: 861-877 1984.
- 44) Ashihara, T., Traganos, F., et al.: A comparison of cell cycle-related changes in post-mitotic and quiescent AF 8 cells as measured by cytofluorometry after acridine orange staining. *Cancer Res* 38: 2514-2518 1978.
- 45) 鈴木啓之: 分化に伴う表皮細胞の核の変化. *皮膚臨床* 20: 581-584 1978.
- 46) 山岡憲夫, 田川 泰, 他: 各臓器別固形癌の悪性度の判定に関する研究 とくに Flow Cytometry による細胞内 DNA-RNA 量解析. *外科治療* 55: 116-117 1986.
- 47) 山岡憲夫, 田川 泰, 他: 胸部固形癌の Flow Cytometry による DNA-RNA 量と臨床病理学的検討. *J Jpn Cancer Ther* 20: 1956 1985.
- 48) 牧山隆雄, 田川 泰, 他: Flow Cytometry による大腸癌症例の検討. *J Jpn Cancer Ther* 20: 1957 1985.
- 49) Klein, F.A., Herr, H.W., et al.: An evaluation of automated flow cytometry (FCM) in detection of carcinoma in situ of the urinary bladder. *Cancer* 50: 1003-1008 1982.
- 50) Klein, F.A., Melamed, M.R., et al.: Cha-

- racterization of bladder papilloma by two-parameter DNA-RNA flow cytometry. *Cancer Res* 42: 1094-1097 1982.
- 51) Klein, F.A., Herr, H.W., et al.: Detection and follow-up carcinoma of the urinary bladder by flow cytometry. *Cancer* 50: 389-395 1982.
  - 52) 赤木 清, 中沢 緑, 他: FCMによる腫瘍細胞動態に対する放射線効果の解析. 癌の臨床 27: 1523-1527 1981.
  - 53) 酒井邦夫, 藤田勝三, 他: 分割照射における腫瘍細胞動態の Flow Cytometry による解析 II. 移殖腫瘍の1回照射についての検討. 日本医放会誌 45: 398-402 1985.
  - 54) Thomlinson, R.H. and Gray, L.H.: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9: 539-549 1955.
  - 55) 安部庄作, 牧村士郎, 他: 肺小細胞癌細胞の核形態と核 DNA 量の関係—化学療法の効果との関連から—, 日臨細胞会誌 25: 12-19 1986.
  - 56) 長瀬千秋: 組織培養による制癌剤感受性試験の開発の試みとその臨床応用について, 組織培養 5: 46-51 1979.
  - 57) 小浜源都: 口腔癌の化学療法効果に関する臨床, 病理, 細胞性免疫学的研究—特に臨床病理学的悪性度とブレオマイシン効果および予後について— 口科誌 33: 672-698 1984.
  - 58) 大関 悟: 口腔粘膜扁平上皮癌に対する Bleomycin の効果 第1編 Bleomycin 術前投与の意義に関する臨床的ならびに病理組織学的研究. 口科誌 30: 206-237 1981.
  - 59) 山本悦秀, 砂川 元, 他: 口腔癌の術前化学療法に関する研究 第1報 臨床病態所見と BLM 術前投与による腫瘍縮小効果との関連性. 口科誌 29: 19-27 1980.
  - 60) 天神美夫, 杉下 匡, 他: フローサイトメトリの癌臨床への応用 癌性腹膜炎の化学療法への応用と評価. 癌と化学療法 9: 1179-1190 1982.
  - 61) 藤田 浩: 癌化学療法剤作用機序概説 (2)—Cell Kill Kinetics よりの考察— 臨床科学 16: 1472-1477 1980.
  - 62) 林 健興: 放射線治療に伴う子宮頸癌の cell kinetics—特に落射型蛍光顕微鏡光法による核 DNA 変化の解析— 日産婦誌 36: 2138-2146 1984.
  - 63) 赤沢修吾: 癌研究の最前線 11 既知抗癌剤の新しい投与法の進歩 モノトレキセート/5-フルオウラシル時間差投与法の理論と臨床成績. 蛋白質 核酸 酵素 31: 1-8 1986.
  - 64) Schneiderman, M.H., Dewey, W.C., et al.: Use of the mitotic selection procedure for cell cycle analysis comparison between the X-ray and cycloheximide G_2 markers. *Exp Cell Res* 74: 430-438 1972.
  - 65) 松平寛通: 癌細胞の放射線感受性とその modification—その基礎, 癌の臨床 13: 554-574 1967.
  - 66) 田坂 皓, 他編: 放射線医学大系 35 放射線生物学 病理学, 第1版, 中山書店, 東京, 1984, 25-50頁.
  - 67) 丸山 清: 悪性腫瘍の核酸代謝に及ぼす放射線の影響. 信州医誌 8: 1495-1504 1959.
  - 68) Stadler, B.M., Kristensen, F., et al.: Thymocyte activation by cytokines: Direct assessment of G_0 - G_1 transition by flow cytometry. *Cell Immunol* 55: 436-443 1980.
  - 69) Gabutti, V., Pileri, A., et al.: Proliferative potential of out-of-cycle leukaemic cells. *Nature* 224: 375-376 1969.
  - 70) Chan, B.W.B. and Hayhoe, F.G.J.: Changes in proliferative activity of marrow leukemic cells during and after extracorporeal irradiation of blood. *Blood* 37: 657-663 1971.
  - 71) 佐々木 寛: 放射線照射による子宮頸癌細胞の G_2 M 期同調化現象の研究, 特に核 DNA 量の解析とその臨床的意義について. *J Jpn Soc Cancer Ther* 16: 1456-1467 1981.
  - 72) Salmon, S.: Expansion of the growth fraction in multiple myeloma with alkylating agents. *Blood* 45: 119-129 1975.
  - 73) Drewinko, B., Brown, B.W., et al.: Effect of chemotherapy on the labelling index of myeloma cells. *Cancer* 34: 526-531 1974.
  - 74) Zittoun, R., Bouchard, M., et al.: Prediction of the response to chemotherapy in acute leukemia. *Cancer* 35: 507-513 1975.
  - 75) Burke, P.J., Owens, A.H., et al.: Attempted recruitment of leukemic myeloblasts to proliferative activity by sequential drug treatment. *Cancer* 28: 830-836 1971.
  - 76) 紺谷第二, 富田勝郎, 他: Cell Cycle からみた Chemotherapy 後における腫瘍細胞集団の推移. 整形外科基礎科学 12: 554-557 1985.
  - 77) Peel, S. and Fletcher, P.A.: Changes occurring during the growth of Ehrlich ascites cells in vivo. *Eur J Cancer* 5: 581-589 1969.
  - 78) Kal, H.B., Hatfield, M., et al.: Cell cycle progression of murine sarcoma cells after X irradiation or heat shock. *Radiology* 117: 215-217 1975.
  - 79) 栗田茂二朗, 清川兼輔, 他: 頭頸部癌に対するシスプラチン・ペブロマイシン併用療法の組織効果. *J Jpn Soc Cancer Ther* 20: 2126-2134 1985.