フローサイトメトリーによる口腔白板症の細胞核 DNA 量の検討

斎藤 徹*・野谷 健一*・三浦尚徳*・戸塚靖則**,**
 福田 博*・水野重孝***・進藤正信****・雨宮 璋****

DNA analysis of oral leukoplakias by flow cytometry

Tohru SAITO*・Ken-ichi NOTANI*・Hisanori MIURA*
 Yasunori TOTSUKA*,**・Hiroshi FUKADA*・Shigetaka MIZUNO***
 Masanobu SHINDOH****・Akira AMEMIYA****

Abstract: We investigated nuclear DNA contents of 21 oral leukoplakias by flow cytometry. Of the 21 leukoplakias, 6 cases (29%) were aneuploid. According to clinical examination, these leukoplakias were divided into a non-elevated type (10 cases), an elevated type (10 cases) and an elevated type with erosive lesion (1 case). One out of the 10 (10%) non-elevated cases, 4 out of the 10 (40%) elevated cases and 1 out of the 1 (100%) elevated case with erosive lesion were aneuploid. Histopathologically, marked epithelial dysplasia was noted in 3 cases and moderate dysplasia was observed in 10 cases. No obvious dysplasia was seen in the other 8 cases. Two out of the 3 (67%) cases with marked dysplasia, 2 out of the 10 (20%) with moderate dysplasia and 2 out of the 8 (25%) without obvious dysplasia were aneuploid.

Key words: oral leukoplakia (口腔白板症), DNA ploidy (DNA ploidy), flow cytometry (フローサイトメトリー)

緒 言

口腔白板症は前癌病変の1つとして知られている¹⁻⁷⁾。一般には口腔白板症の3～6%が癌化すると報告されている¹⁻⁶⁾が、Silverman ら⁷⁾は163例の口腔白板症中18%が癌化したと報告している。口腔白板症の malignant potential を検討する方法として病理組織学的検索が主に用いられており、上皮異形成の有無および程度がその主な指標と考えられている¹⁻⁵⁾。しかし、口腔白板症に

おける上皮異形成の有無と malignant potential との関連は必ずしも明確ではなく³⁻⁶⁾、個々の口腔白板症の malignant potential を的確に判定するためには、病理組織学的検索に加えて他の検査法も応用してゆく必要があると考えられる。

他方、ヒトの大部分の体細胞は二倍体であり DNA 量は一定であり、異数倍数体細胞の出現は一般には前癌病変あるいは癌化の指標の1つと考えられている⁸⁻¹⁷⁾。近年、大腸^{10,11,13)}、皮膚^{14,15)}などの前癌病変において、異数倍数体細胞が比較的高頻度に出現することが報告され

* 北海道大学歯学部口腔外科学第一講座
 (主任：福田 博教授)

** 北海道大学歯学部附属病院特殊歯科治療部
 (主任：中村進治教授)

*** 北海道大学歯学部附属病院中央検査室
 (主任：桑島俊彦)

**** 北海道大学歯学部口腔病理学講座
 (主任：雨宮 璋教授)

* Hokkaido University School of Dentistry,
 First Department of Oral Surgery (Chief:
 Prof. Hiroshi Fukuda)

** Hokkaido University School of Dentistry,
 Department of Special Clinic (Chief: Prof.
 Shinji Nakamura)

*** Hokkaido University School of Dentistry,
 Central Clinical Laboratory (Chief: Toshi-
 hiko Kuwazima)

**** Hokkaido University School of Dentistry,
 Department of Oral Pathology (Chief: Prof.
 Akira Amemiya)

受付日：平成3年1月14日

表 1 対象症例の部位と症例数

部 位	症例数
歯肉	9
舌	7
口蓋	2
頬粘膜	2
口底	1
計	21

ており、細胞核 DNA 量の異常とこれらの前癌病変の malignant potential との関連が推測されている。今回われわれは、口腔白板症の malignant potential を検討することを目的として、細胞核 DNA 量と臨床所見および病理組織学的所見との関連を検討した。

対象と方法

1. 対 象

北海道大学歯学部附属病院口腔外科を受診した口腔白板症21症例を対象とした。白板症の診断基準は WHO の定義¹⁾に従い、擦過により除去できない白斑で、臨床的にも病理組織学的にも他の疾患に分類できないものとした。口腔白板症の部位およびその症例数は、歯肉9例、舌7例、口蓋2例、頬粘膜2例、口底1例であった(表1)。対照として、口腔扁平上皮癌50症例、口腔良性腫瘍14症例および正常歯肉11例の DNA 量を検索した。

2. 病理組織学的検索

試験切除組織あるいは手術標本を10%中性ホルマリンにて固定後、ヘマトキシリン-エオジンにて染色し、病理組織学的検索を施行した。上皮異形成の有無の判定は Banoczy の診断基準²⁾に準じ、以下の組織学的所見を2つ以上有する症例を上皮異形成陽性症例とした。1) 基底細胞の極性の喪失、2) 一層以上の基底細胞様外観を有する細胞の存在、3) 核/細胞質比の増大、4) 滴状型の上皮突起、5) 不規則な上皮の重層、6) 有糸分裂像の増加、7) 上皮層の上半分における有糸分裂像の存在、8) 細胞多形性、9) 核の過染色性、10) 核小体の増大、11) 細胞結合の減退、12) 棘細胞層における単一細胞または細胞群の角化。以上の組織学的所見を、2から4つ示した症例を軽度の上皮異形成を認めた症例とした(写真1)。また、これらの組織学的所見を5つ以上示した症例を高度の上皮異形成を認めた症例とした(写真2)。

3. DNA 量の検索

細胞核 DNA 量の測定にはフローサイトメトリーを用いた⁹⁻¹¹⁾。試験切除組織あるいは切除組織の一部(1×1×2 mm 程)を80%エタノールにて固定後細切し、金属

写真 1 軽度異形上皮：基底細胞層の多層化ときわめて軽度の異型性を示す細胞が認められる。(×125)

写真 2 高度異形上皮：上皮の不規則な伸長が認められる。上皮細胞には、核の大小不同、クロマチンの濃淡などの異型性が著明である。(×125)

メッシュで濾過し細胞浮遊液とした。細胞浮遊液を PBS で洗浄後、ペプシン処理にて裸核化し、RNase で処理の後、propidium iodide にて核 DNA を蛍光染色した。蛍光量の測定は Cytofluorograf 50 H (Ortho 社、米国)を使用し、測定された蛍光量は相対的 DNA 量として DNA ヒストグラム上に表示した。正常二倍体リンパ球の DNA 量を internal standard として用いた。検体の DNA 量は検体の G₀/G₁ 期細胞のピークのチャンネル数と正常リンパ球のそれとの比、DNA index (DI) で表示した。DI が 1.0 である症例を二倍体とし、二倍体細胞の G₀/G₁ 期のピークとは明らかに異なる G₀/G₁ 期のピークを示した症例を異数倍体とした^{15,19)}。

表 2 口腔白板症, 扁平上皮癌, 良性腫瘍および正常歯肉の DNA ploidy

	症例数	異数倍数体 症例数 (%)	DI の Range	異数倍数体 症例の 平均 DI
白板症	21	6(29)	0.70—1.62	1.12
扁平上皮癌	50	24(48)	0.87—2.23	1.54
良性腫瘍	14	0(0)	1.00	—
正常歯肉	11	0(0)	1.00	—

表 3 白板症の臨床所見と DNA ploidy との関連

臨床所見	症例数	異数倍数体 症例数 (%)
平坦型	10	1 (10)
隆起型	10	4 (40)
隆起+紅斑型	1	1(100)
計	21	6 (29)

表 4 白板症の組織学的所見と DNA ploidy との関連

上皮異形成	症例数	異数倍数体 症例数 (%)
高度	3	2 (67)
軽度	10	2 (20)
なし	8	2 (25)
計	21	6 (29)

結 果

1. 口腔白板症, 口腔扁平上皮癌, 口腔良性腫瘍および正常歯肉の DNA ploidy

表 2 に示すように, 対象とした 21 症例の白板症中 6 症例 (29%) が異数倍数体であり, 異数倍数体症例の DI の平均は 1.12 であった。また, 当科で細胞核 DNA 量を検索した口腔扁平上皮癌 50 症例中異数倍数体は 24 症例 (48%) であり, 異数倍数体症例の DI の平均は 1.54 であった。口腔良性腫瘍 14 症例および正常歯肉 11 例はすべて二倍体であった。

2. 口腔白板症の臨床所見と DNA ploidy との関連

対象とした口腔白板症の臨床所見は, 平坦型が 10 症例, 隆起型が 10 症例であり, 隆起型に紅斑が混在していたもの 1 症例であった (表 3)。異数倍数体であった症例は平坦型が 1 症例 (10%), 隆起型が 4 症例 (40%), 隆起型に紅斑が混在していたもの 1 症例 (100%) であった (表 3)。平坦型と比較して隆起型に異数倍数体細

図 1 高度の上皮異形成を示した異数倍数体症例の DNA ヒストグラム (DI=1.62)。

図 2 軽度の上皮異形成を示した異数倍数体症例の DNA ヒストグラム (DI=1.13)。

胞の出現頻度が高い傾向が認められた。

3. 口腔白板症の病理組織学的所見と DNA ploidy との関連

組織学的に高度および軽度の上皮異形成を認めた症例は, それぞれ 3 症例および 10 症例であった。他の 8 症例では明確な上皮異形成は認められなかった (表 4)。高度の上皮異形成を認めた 3 症例中 2 症例 (67%) および軽度の異形成を認めた 10 症例中 2 症例 (20%) が異数倍数体であった。また, 明確な上皮異形成が認められなかった 8 症例中 2 症例 (25%) が異数倍数体であった (表 4)。高度の上皮異形成を認めた症例では, 異数倍数体

図3 軽度の上皮異形成を示した二倍体症例の DNA ヒストグラム (DI=1.00).

細胞の出現頻度が高い傾向が認められたが、上皮異形成の有無と異数倍体細胞の出現頻度との関連は明確ではなかった。

4. 口腔白板症の DNA ヒストグラム

図1は高度の異形成を認めた異数倍体細胞症例の DNA ヒストグラムであり、DI が1.00の部分に二倍体細胞の G_0/G_1 期のピーク、および DI が1.62の部分に異数倍体細胞の G_0/G_1 期の小さなピークを認める。図2は軽度の異形成を認めた異数倍体細胞症例の DNA ヒストグラムであり、DI が1.00の部分に二倍体細胞の G_0/G_1 期のピーク、および DI が1.13の部分に異数倍体細胞の G_0/G_1 期のピークを認める。図3は軽度の異形成を認めた二倍体症例の DNA ヒストグラムであり、DI が1.00の部分に二倍体細胞の G_0/G_1 期のピークを認める。

考 察

口腔白板症は前癌病変の1つとして知られており、癌化の頻度は一般には3～6%と報告されている¹⁻⁶⁾。口腔白板症の malignant potential を評価する方法として、一般には病理組織学的検索が行われ、上皮異形成の有無および程度がその主な指標と考えられている¹⁻⁵⁾。しかし、上皮異形成を伴う口腔白板症が癌化する頻度は、報告によっては7～36%と必ずしも一定ではない³⁻⁵⁾。また、Hogewind ら⁶⁾は、口腔白板症46症例の follow-up study から、平均観察期間5年で癌化した3症例のうち2症例が、経過観察前の生検では上皮異形成が認められなかったことを報告している。すなわち、口腔白板症における上皮異形成の有無と malignant potential との関連は必ずしも明確ではない。したがって、個

々の口腔白板症の malignant potential を判定するためには、病理組織学的検索に加えて他の検査法も必要であると考えられる。

近年、皮膚白板症および砒素角化症^{14,15)}、子宮頸部粘膜異形成¹⁶⁾および大腸腺腫^{10,12,13)}などの前癌病変において、異数倍体細胞が比較的高頻度に出現することが報告されている。また、子宮頸部などの前癌病変において、異数倍体細胞の病変は癌化する可能性が高いことも報告されており^{17,20,21)}、前癌病変の malignant potential と DNA ploidy との関連が推測されている。本研究から、口腔白板症においても異数倍体細胞が比較的高頻度(29%)に出現することが認められた。さらに、口腔良性腫瘍および正常歯肉はすべて二倍体であったが、口腔扁平上皮癌50症例中24症例(48%)が異数倍体であった。このことから、口腔領域における異数倍体細胞の出現は、前癌病変→癌化の過程と関連していることが推測される。

一方、本研究においては平坦型白板症では二倍体が多く、隆起型においては異数倍体が多い傾向が認められ、口腔白板症の臨床所見と DNA ploidy とが相関する傾向が認められた。口腔白板症の癌化の過程は、一般には平坦型白板症から隆起型あるいは紅斑型白板症へ推移し、さらに癌へと移行すると考えられており、隆起型および紅斑混在型白板症の malignant potential が、平坦型と比較して高いと考えられる。したがって、異数倍体細胞を伴う口腔白板症が高い malignant potential を有する可能性が示唆される。このことから、DNA ploidy が口腔白板症の malignant potential を評価する指標の1つとなりうる可能性が推測される。

他方、本研究においては、組織学的に高度の上皮異形成を認めた症例では異数倍体細胞の出現頻度が高い傾向が認められたが、上皮異形成の有無と DNA ploidy との関連は明確ではなかった。Ingh ら¹⁰⁾および Quirke ら¹²⁾も、大腸腺腫においては、DNA ploidy と上皮異形成の有無およびその程度との間には、明確な関連が認められなかったことを報告している。すなわち、前癌病変においては、DNA ploidy は必ずしも病理組織学的所見と相関するものではないと考えられる。さらに Mitelman ら²²⁾および Spandidos ら²³⁾は、大腸腺腫において、著明な異型性などの癌への移行を疑わせる組織学的変化のない症例においても、異数倍体細胞の出現、染色体異常および癌遺伝子の増幅が認められることを報告している。これらの報告は、前癌病変から癌へ移行する過程において、DNA 量の異常などの遺伝学的変化が形態学的な変化に先行することを示唆するものと考えられる。したがって、malignant potential の高い前癌病変にもかかわらず、癌への移行を疑わせる明確な組織学的所見のない症例においても、DNA ploidy が malignant potential の重要な指標の1つとなりうる可能性が考えられる。

本研究においては口腔白板症の DNA 量を検索したが、口腔白板症における DNA の質的变化の有無および程度は不明である。癌化には、DNA 量の異常の有無にかかわらず遺伝学的変化は必須であると考えられる。前癌病変においても、malignant potential を有するものであればなんらかの遺伝学的変化を伴うことが推測される。したがって、前癌病変の malignant potential の有無および程度を解析するためには、DNA 量の検索のみでは不十分であろうと思われる。大腸腺腫などの前癌病変において、染色体異常および ras 癌遺伝子の増幅が認められることが報告されている²²⁻²⁵⁾ことから、口腔白板症においてもこれらの遺伝学的異常が出現している可能性が推測される。しかし、口腔白板症の malignant potential とこれらの遺伝学的異常との関連は明確ではなく、今後検討して行く必要があると思われる。

ま と め

1. 口腔白板症21症例の DNA ploidy をフローサイトメトリーを用いて検索した結果、6 症例 (29%) が異数倍体であった。

2. 口腔白板症における異数倍体細胞の出現頻度と、臨床所見が相関する傾向が認められたが、上皮異形成の有無との関連は明確ではなかった。

本論文の要旨の一部は、第35回日本口腔外科学会総会 (平成2年10月、岡山) において発表した。

引用文献

- 1) WHO Collaborating centre for oral precancerous lesions: Definition of leukoplakia and related lesions; An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg* 46: 518-539 1978.
- 2) Pindborg, J.J.: Oral cancer and precancer. Wright, Bristol, 1980, p 12-19.
- 3) Banoczy, J.: Oral leukoplakia. Martinus Nijhoff, London, 1982, p 64-86.
- 4) Mincer, H.H., Coleman, S.A., et al.: Observations on the clinical characteristics of oral lesions showing histologic epithelial dysplasia. *Oral Surg* 33: 389-399 1972.
- 5) Pindborg, J.J., Daftary, D.K., et al.: A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. *Oral Surg* 43: 383-390 1977.
- 6) Hogewind, W.F.C., Kwast, W.A.M., et al.: Oral leukoplakia, with emphasis on malignant transformation. A follow-up study of 46 patients. *J Cranio-Max-Fac Surg* 17: 128-133 1989.
- 7) Silverman, S., Gorsky, M., et al.: Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 53: 563-568 1984.
- 8) Bohm, N., Sandritter, W.: DNA in human tumor; A cytophotometric study. *Curr Top Pathol* 60: 151-218 1975.
- 9) Tribukait, B., Hammarberg, C., et al.: Ploidy and proliferation patterns in colo-rectal adenocarcinomas related to Dukes' classification and histopathological differentiation; A flow cytometric study. *Acta Pathol Microbiol Immu Scand* 91: 89-95 1983.
- 10) Ingh, H.F., Criffioen, G., et al.: Flow cytometric detection of aneuploidy in colorectal adenomas. *Cancer Res* 45: 3392-3397 1985.
- 11) Emdin, S.O., Stenling, R., et al.: Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. A flow cytometric study with some methodologic aspects. *Cancer* 60: 1282-1287 1987.
- 12) Quirke, P., Fozard, J.B.J., et al.: DNA aneuploidy in colorectal adenomas. *Br J Cancer* 53: 477-481 1986.
- 13) Staiano-Coico, L., Wong, R., et al.: DNA content of rectal scrapings from individuals at low and high risk for the development of colorectal cancer. *Cancer* 64: 2579-2584 1989.
- 14) Otsuka, F., Shima, A., et al.: Porokeratosis as a premalignant condition of the skin. Cytologic demonstration of abnormal DNA ploidy in cells of the epidermis. *Cancer* 63: 891-896 1989.
- 15) Ehlers, G., Stephan, T.: Quantative histochemical investigations on the DNA-content of facultative and obligatory precancerous of the skin; On the DNA-content of so-called facultative precancerous. *Arch Dermatol Forsch* 243: 114-132 1972.
- 16) Wagner, D., Sprenger, E., et al.: DNA-content of dysplastic cells of uterine cervix. *Acta Cytol* 16: 517-522 1972.
- 17) Tribukait, B., Gustafson, H., et al.: The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumors; A study of 100 untreated cases. *Br J Urol* 54: 130-135 1982.
- 18) 磯部 宏, 伊藤正美, 他: Flow cytometry による原発性肺癌細胞の核 DNA 量の解析, *肺癌* 27: 125-132 1987.
- 19) 水野重孝, 磯部 宏, 他: Flow cytometry のための肺癌組織細胞分散法の検討—ペプシン消化法について—, *日臨細胞誌* 26: 621-627 1987.
- 20) Fu, Y., Reagan, J.W., et al.: Definition of precursors. *Gynecol Oncol* 12: 220-231 1981.

- 21) Jakobsen, A., Back Kristensen, P., et al.: Flow cytometric classification of biopsy specimens from cervical intraepithelial neoplasia. *Cytometry* 4: 166-169 1983.
- 22) Mitchman, G., Mark, J., et al.: Chromosome banding pattern in human colonic polyps. *Hereditas* 78: 63-68 1974.
- 23) Spandidos, D.A., Kerr, I.B.: Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumors of colorectum. *Br J Cancer* 49: 681-688 1984.
- 24) Reichmann, A., Martin, P., et al.: Karyotypic findings in a colonic villous adenoma. *Cancer Genet Cytogenet* 7: 51-57 1982.
- 25) Enterline, H.T. and Arvan, D.A.: Chromosome constitution of adenoma and carcinoma of the colon. *Cancer* 20: 1764-1769 1967.