口腔扁平上皮癌および良性疾患における核小体形成体 (Ag-NORs) の発現に関する検討

早津良和・松村耕治・辻 龍雄
井上 敬・森本宏志*・篠崎文彦

Study on the nucleolar organizer regions associated protein (Ag-NORs) in oral squamous cell carcinoma and benign lesions

Yoshikazu HAYATSU・Kouji MATSUMURA・Tatsuo TSUJI
Takashi INOUE・Hiroshi MORIMOTO*・Fumihiko SHINOZAKI

Abstract: By using a silver staining technique, nucleolar organizer regions associated protein (Ag-NORs) have been studied in paraffin sections of oral squamous cell carcinomas, benign lesions, such as leukoplakia and papilloma, and normal oral mucosa. The mean numbers of Ag-NORs were: squamous cell carcinoma (n=19), 6.18 ± 1.84 ; papilloma (n=9), 2.70 ± 0.50 ; leukoplakia (n=10), 2.92 ± 0.69 ; normal oral mucosa (n=4), 2.48 ± 0.13 . There was a significant difference in the mean number of Ag-NORs between squamous cell carcinoma and the other two groups ($P > 0.05$). The number of Ag-NORs seemed to have relations to the cellular atypism of squamous cell carcinoma and the grade of epithelial dysplasia of leukoplakia. These findings suggest that quantification of Ag-NORs may be used for differential diagnosis of malignant and benign oral tumors, and estimation of proliferative activity of oral preneoplastic and neoplastic lesions.

Key words: nucleolar organizer regions (核小体形成体), oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌), cellular atypism (細胞異型度)

緒 言

核小体形成体 (Nucleolar organizer regions; NORs) は、蛋白合成を行うリボゾームの合成に関与している核小体の形成に重要な働きを担っている。このため NORs

は細胞の蛋白合成能力ひいては増殖力と密接な関係があると考えられている。この NORs の主体はリボゾーム RNA を転写する DNA のループにあり¹⁾、ヒトの正常染色体では D 群 (No. 13~15) と G 群 (No. 21, 22) の短腕部にあることが分かっている²⁾。

最近、銀コロイド染色法の開発³⁾により、核小体形成体の関連蛋白 (Argyrophilic nucleolar regions associated protein; Ag-NORs) を容易かつ迅速に染色することが可能になり、種々の臓器において腫瘍の良性、悪性の鑑別や悪性度の指標に用いられている^{4~11)}。

今回、われわれは口腔扁平上皮癌および良性疾患における Ag-NORs の発現に関して検討を行ったので報告する。

対 象 と 方 法

1. 対象症例

検索対象は、山口大学医学部附属病院歯科口腔外科を

山口大学医学部歯科口腔外科学講座
(主任：篠崎文彦教授)

* 山口大学医学部病理学第2講座
(主任：高橋 学教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Medicine, Yamaguchi University
(Chief: Prof. Fumihiko Shinozaki)

* 2nd Department of Pathology, School of Medicine,
Yamaguchi University (Chief: Prof. Manabu Takahashi)

受付日：平成4年2月20日

表 1 Ag-NORs 染色法

- 1) ホルマリン固定, パラフィン包埋
- 2) 3 μ m 切片
- 3) 脱バラ
- 4) 後固定 (エタノール, 酢酸)
- 5) 水 洗
- 6) 染色 (室温30分)
- 7) 水 洗
- 8) 脱水, 透徹, 封入

染色液 A : 2%ゼラチン 1 %ギ酸

B : 50%硝酸銀液

使用直前に A, B を 1 : 2 に混合する.

表 2 正常口腔粘膜および各種疾患の平均 Ag-NORs 数

組織型	症例数	Ag-NORs 数	S.D.
正常口腔粘膜	4	2.48 (2.36~2.69)	0.13
白板症	10	2.92 (1.65~4.30)	0.69
乳頭腫	9	2.70 (2.11~3.61)	0.50
扁平上皮癌	19	6.18 (4.08~11.92)	1.84

* $P < 0.05$

受診し, 検索しえた 頭頸部扁平上皮癌 19 例, 白板症 10 例, 乳頭腫 9 例, ならびに正常口腔粘膜 4 例である. 扁平上皮癌症例は男性 13 例, 女性 6 例で, 年齢は 44~74 歳であった. 部位は口底 7 例, 舌 5 例, 歯肉, 上顎洞各 3 例, 口蓋 1 例であった. 白板症症例は男性 3 例, 女性 7 例で, 年齢は 29~75 歳であり, 舌, 歯肉各 4 例, 頬粘膜 2 例であった. 乳頭腫症例は, 男性 2 例, 女性 7 例で, 年齢は 10~72 歳であり, 舌 5 例, 歯肉 2 例, 口蓋, 下唇各 1 例であった.

2. 研究方法

Ag-NORs の染色は, ホルマリン固定パラフィン包埋後, 3 μ m の切片を作製し, 脱バラ後, Ploton ら¹²⁾の方法に準じて行った (表 1).

Ag-NORs の個数は, 400 倍顕微鏡下に細胞 100 個の Ag-NORs 染色陽性顆粒数を数え, 細胞 1 個当りの平均 Ag-NORs 数を算定した.

結 果

各疾患の平均 Ag-NORs 数は白板症では 2.92 ± 0.69 , 乳頭腫では 2.70 ± 0.50 , 扁平上皮癌では 6.18 ± 1.18 であ

図 1 白板症における異形成別の Ag-NORs 数

図 2 扁平上皮癌分化度別の Ag-NORs 数

り, 正常口腔粘膜では 2.48 ± 0.13 であった (写真 1). Ag-NORs 数に関して正常口腔粘膜, 白板症, 乳頭腫と扁平上皮癌との間には有意差 (t 検定, $P < 0.05$) を認めたが, 正常口腔粘膜と白板症, 乳頭腫との間には有意差はなかった (表 2).

白板症の上皮異形成を程度により 3 段階 (ー~++) に分け, それぞれの Ag-NORs 数について比較した. 上皮異形成ー (n=3) では Ag-NORs 数は 2.52 ± 0.74 で, 上皮異形成+ (n=4) では 2.92 ± 0.34 , 上皮異形成++ (n=3) では 3.32 ± 0.96 であった (図 1). 有意差は認めなかったが, 上皮異形成が増すに従い Ag-NORs 数も増加する傾向にあった.

扁平上皮癌症例において, 分化度別に Ag-NORs 数をみると, 高分化型 6.18 ± 1.26 (n=5), 中分化型 6.30 ± 2.20 (n=12), 低分化型 5.28 ± 0.28 (n=2) であった (図 2). 症例数に偏りがあるが, 分化度と Ag-NORs 数

写真 1 Ag-NORs 染色の顕微鏡像

- a: 正常口腔粘膜 b: 白板症 (舌, 異形成)
c: 乳頭腫 (舌) d: 扁平上皮癌 (舌, 高分化, 低異型度)

との間には関連性は認められなかった。

扁平上皮癌の異型度と Ag-NORs 数との関連では、低異型度 5.54 ± 0.88 ($n=6$), 中異型度 5.68 ± 1.49 ($n=5$), 高異型度 6.89 ± 2.44 ($n=8$) であり、異型度が増すに従い Ag-NORs 数は増加する傾向がみられた (図 3)。

考 察

一般に静止期の細胞において、核小体に近接して酸性

リン酸化蛋白が認められる¹³⁾。これらの蛋白は好銀、非ヒストン酸性蛋白で、銀染色により染色され、核小体形成体関連蛋白 (Ag-NORs) とよばれている¹⁴⁾。この染色は Nバンド染色法とよばれ、染色体検査に用いられていたが、1980 年に Howell and Black³⁾ がゼラチンを用いた銀コロイド染色法を報告して以来、簡便で迅速に行え、再現性のある染色法としてパラフィン切片にも応用されるようになった。

Ag-NORs に関して、生物学的には十分に解明されていないが、RNA polymerase I¹⁵⁾や C23 蛋白などに関

図3 扁平上皮癌異型度別のAg-NORs 数

連があると考えられている¹³⁾。また、Ag-NORs 数はKi-67 陽性細胞数¹⁵⁾、BrdU 標識率¹⁶⁾、DNA フローサイトメトリーによるS 期細胞数¹⁷⁾とよく相関する。これらのことからAg-NORs 数は細胞増殖能を示す指標と考えられ、これまで造血器⁴⁾、肺^{5,8)}、乳腺^{6,18)}、消化器^{7,11)}、膀胱¹⁹⁾、皮膚⁹⁾などのさまざまな腫瘍でAg-NORs 数の測定が良性、悪性の判定に有用であると報告されている。最近では、Ag-NORs 染色の細胞診への応用も報告^{8,18,20)}されている。口腔外科領域では当科のMatsumura ら¹⁰⁾が唾液腺腫瘍において、悪性腫瘍ではAg-NORs 数が有意に多く、良性、悪性の鑑別に有用であることを報告している。今回のわれわれの結果でも、乳頭腫、白板症の良性疾患群に比較して扁平上皮癌ではAg-NORs 数が有意に多かった。しかしながら、良性疾患群と正常口腔粘膜との間にはAg-NORs 数にほとんど差が認められなかった。

白板症症例においては異形成が、扁平上皮癌症例においては異型度が増すに従い、統計学的に有意差はなかったがAg-NORs 数が増加する傾向が認められた。したがって、Ag-NORs 数は上皮異形成の程度を表す1つの指標となりうると考えられた。白板症では上皮の異形成的变化を認めたものは、認めなかったものに比べ約8 倍の悪性化率であったことが報告²¹⁾されており、臨床において異形成を判定することは重要である。またこれまで、悪性リンパ腫⁴⁾、胃癌¹¹⁾、膀胱の移行上皮癌¹⁹⁾においてAg-NORs 数と腫瘍の異型度には相関があることが報告されており、われわれの扁平上皮癌においても同様の結果が得られた。異型度は扁平上皮癌において、予後に大きく関与する因子の1つと考えられている²²⁾。したがって、Ag-NORs 数の測定は悪性度の評価の一助となることが示唆される。一方、腫瘍の分化度とAg-NORs

数との間には相関は認められなかった。Ag-NORs 数の増加は細胞増殖能の高い細胞核内では核小体の解離が生じ、Ag-NORs が分散する結果であると説明されている²³⁾。

これまで細胞増殖能の評価には、BrdU、Ki-67、DNA フローサイトメトリーなどが用いられていたが、いずれも新鮮組織が必要であり、検体の取り扱いが繁雑であったり、熟練した手技が要求された。このようなことから臨床における応用には制約があった。これに対してAg-NORs は、ホルマリンもしくはエタノール固定パラフィン包埋された標本で染色が可能であり、染色操作も簡便で、短時間で行える利点をもち、広く臨床応用が可能であると考えられる。最近、Ag-NORs 数、面積などをより客観的に解析するため、画像解析装置を利用した自動解析も行われるようになってきた¹⁸⁾。また、Ag-NORs 数は悪性腫瘍における化学療法効果を反映¹⁹⁾することも指摘されており、今後われわれもさらに症例数を増やし詳細な検討をしていく予定である。

結 語

今回われわれは口腔扁平上皮癌、乳頭腫、白板症におけるAg-NORs の発現に関して検討を行い、以下の結果を得た。

- 1) 扁平上皮癌は乳頭腫、白板症に比べてAg-NORs 数が有意に多かった。
- 2) 乳頭腫、白板症と正常口腔粘膜との間にはAg-NORs 数に有意な差はなかった。
- 3) 白板症においては上皮異形成が、また扁平上皮癌では異型度が増すに従いAg-NORs 数が増加する傾向が認められた。

以上、Ag-NORs 数は口腔粘膜病変の増殖能の評価や良性、悪性の鑑別の一助として臨床応用ができるのではないかと考えられた。

本論文の要旨は、第45回日本口腔科学会総会(1991年5月17日、京都)において発表した。

引 用 文 献

- 1) Alberts, B., Bray, D., et al.: Molecular biology of the cell. Garland, New York, 1983, p 424-426.
- 2) Goodpasture, C. and Bloom, S.E.: Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma 53: 37-50 1975.
- 3) Howell, W.M. and Black, D.A.: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015 1980.

- 4) Crocker, J. and Nar, P.: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 151: 111-118 1987.
- 5) Crocker, J., Ayres, J., et al.: Nucleolar organizer regions in small cell carcinoma of the bronchus. *Thorax* 42: 972-975 1987.
- 6) Giri, D.D., Lawry, N.J., et al.: Silver-binding nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in benign and malignant breast lesions: Correlations with Ploidy and DNA flow cytometry. *J Pathol* 157: 307-313 1989.
- 7) Derenzini, M., Romagnoli, T., et al.: Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. *Virch Arch B Cell Pathol* 54: 334-340 1988.
- 8) 小倉滋明, 阿部庄作, 他: Nucleolar organizer regions からみた気管支上皮異型過形成細胞と腺癌細胞の相違. *肺癌* 29: 771-776 1989.
- 9) Egan, M.J. and Crocker, J.: Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *J Pathol* 154: 247-253 1988.
- 10) Matsumura, K., Sasaki, K., et al.: The nucleolar organizer regions associated protein (Ag-NORs) in salivary gland tumors. *Int J Oral Maxillofac Surg* 18: 76-78 1989.
- 11) Rosa, J., Mehta, A., et al.: Nucleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor stages. *Histopathology* 16: 265-269 1990.
- 12) Ploton, D., Menager, M., et al.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem J* 18: 5-14 1986.
- 13) Lischwe, M.A., Smetana, K., et al.: Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Life Sci* 25: 701-708 1979.
- 14) Hernandez-Verdun, D.: The nucleolar organizer regions (collective review). *Biol Cell* 49: 191-202 1983.
- 15) Hall, P.A., Crocker, J., et al.: A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immuno staining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 12: 373-381 1988.
- 16) Tanaka, T., Takeuchi, T., et al.: Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylacetamide in rats: Comparison with immunohistochemistry using a monoclonal antibody against bromodeoxyuridine. *Jpn J Cancer Res* 80: 1047-1051 1989.
- 17) Crocker, J., Macartney, J.C., et al.: Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 154: 151-156 1988.
- 18) 坂本寛文, 田中卓二, 他: 乳腺細胞診におけるNORの画像解析. *J Jpn Clin Cytol* 29: 835-838 1990.
- 19) 竹内敏祝: 膀胱腫瘍における核小体形成体の研究. *日泌尿会誌* 81: 1711-1719 1990.
- 20) 坂本寛文, 山田正子, 他: Ag-NORs (Nucleolar organizer regions) 染色の細胞診の応用. *臨床検査* 33: 1800-1802 1989.
- 21) 天笠光雄, 戸塚盛雄, 他: 口腔白板症の臨床型, 治療法と予後に関する研究一特に白板症の悪性化について一. *日口外誌* 24: 243-252 1978.
- 22) 小浜源郁: 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一特に臨床病理学的悪性度とプレオマイシン効果および予後について一. *日口誌* 33: 672-698 1984.
- 23) Derenzini, M., Pession, A., et al.: Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. *Am J Pathol* 134: 925-932 1989.