歯源性嚢胞における上皮増殖能の比較研究

村井正彦・泉 廣次・山本浩嗣*

A comparative study of proliferative activity of epithelia in odontogenic cysts

Masahiko MURAI • Hirotugu IZUMI • Hirotugu YAMAMOTO*

Abstract: The purpose of this study was to compare the proliferative activity of epithelia in odontogenic keratocysts (5 cases), follicular dental cysts (5 cases) and radicular cysts (5 cases) by using nucleolar organizer regions (Ag-NORs) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in conjunction with computer-assisted image analysis. The following results were obtained:

The mean numbers of Ag-NORs were 2.03 ± 0.45 in odontogenic keratocysts, 1.38 ± 0.16 in follicular dental cysts and 1.45 ± 0.21 in radicular cysts. The difference in the mean number of Ag-NORs between odontogenic keratocysts and the other two types of cysts was statistically significant ($P < 0.05$).

PCNA-positive scores were $20.3 \pm 10.3\%$ in odontogenic keratocysts, $11.7 \pm 9.9\%$ in follicular dental cysts and $11.5 \pm 7.3\%$ in radicular cysts. The difference in PCNA-positive score between odontogenic keratocysts and the other two types of cysts was also significant ($P < 0.05$).

However, there was no correlation between the mean number of Ag-NORs and PCNA-positive score. Thus, the epithelia of odontogenic keratocysts had high proliferative activity from the viewpoint Ag-NORs and PCNA.

Key words: Ag-NORs (核小体形成体), PCNA (増殖細胞核抗原), odontogenic cyst (歯源性嚢胞), proliferative activity of epithelium (上皮増殖能)

緒 言

歯源性嚢胞は、口腔外科領域の病変の中では比較的遭遇する機会が多く、基礎的および臨床的な観点から種々な検索がなされてきている。しかし本症は、その発生病

来からさまざまな型があり、それらの上皮増殖能について比較検討した詳細な検索が乏しい。

Ag-NORs (nucleolar organizer regions) は、核小体形成体の関連蛋白質で細胞の増殖能と密接な関係があると考えられており、Ag-NORs 数がいろいろな臓器の腫瘍で良悪の判定の指標として用いられている¹⁻¹¹⁾。

また PCNA (proliferating cell nuclear antigen) は、増殖細胞核抗原としてホルマリン固定、パラフィン包埋切片上で免疫組織化学的に検出ができるため、各種細胞の増殖マーカーとして用いられてきている¹²⁾。

そこで今回、著者らは歯源性嚢胞の中で発育性起源をもつ歯源性角化嚢胞、含歯性嚢胞および炎症性起源をもつ歯根嚢胞について Ag-NORs, PCNA を用い、またその結果を画像解析処理し、それら上皮の増殖能を比較検索したので報告する。

日本大学松戸歯学部第1口腔外科学教室

(主任：泉 廣次教授)

* 日本大学松戸歯学部病理学教室

(主任：山本浩嗣教授)

Department of Oral Surgery, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. Hirotugu Izumi)

* Department of Pathology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. Hirotugu Yamamoto)

受付日：平成5年2月15日

表 1 AgNORs 染色

1) 脱パラフィン後、水洗
2) AgNORs 染色液で40分間遮光して反応
3) 水洗後、0.2%塩化金にて10分間置換
4) 水洗後、定着液(5% ハイポ)に1分間浸漬
5) 水洗、脱水、透徹、封入
Ag-NORs 染色液 A: 2% セラチン 1% 硝酸銀
B: 50% 硝酸銀
A:B を 1:2 の割合に混合

表 2 PCNA 免疫染色

1) 脱パラフィン後、蒸留水(以下 D.W.)にて洗浄、0.01M リン酸緩衝食塩水 pH 7.2 (以下 PBS)にて洗浄
2) 3% H ₂ O ₂ にて5分間反応後、PBSにて5分間洗浄
3) 正常ヤギ血清(20倍希釈)にて5分間反応
4) 抗 PCNA 抗体(20倍希釈)にて40分間反応
5) PBSにて15分間洗浄
6) ビオチン標識抗マウスイムノグロブリン・ヤギ抗体(300倍希釈)にて10分間反応
7) PBSにて15分間洗浄
8) パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて10分間反応
9) PBSにて15分間洗浄
10) 0.02% DAB ³ +0.005% H ₂ O ₂ にて3~10分間発色
11) 水洗後マイヤーヘマトキシリンにて30秒間核染
12) 水洗後、脱水、透徹、封入

材料と方法

検索材料は、 学部附属歯科病院口腔外科にて摘出し、病理組織学的に診断された歯源性角化嚢胞5症例、含歯性嚢胞5症例および歯根嚢胞5症例である。検索方法は、摘出物を摘出後ただちに10%中性ホルマリン液で固定し、通法に従いパラフィンプロック包埋、4μm に薄切し、ヘマトキシリン-エオジン重染色を行い、以下の染色を施した。

1. Ag-NORs の染色は、脱パラ後 Ploton ら¹³⁾の方法に準じて行った(表1)。Ag-NORs の個数は800倍顕微鏡下にて細胞 500 個以上についてオリンパス社製画像解析装置を用い、1細胞あたりにおける核内の顆粒数の平均を算定した。
2. PCNA 免疫染色は、一次抗体としてモノクローナル抗 PCNA 抗体(1:20 希釈, Dako 社, 京都)を40分室温で反応させ Dako 社製 LSAB (Labelled Strept-

表 3 各歯源性嚢胞の平均 Ag-NORs 数

組織型	症例数	平均値±S.D.	範囲
歯源性角化嚢胞	5	2.03±0.45	2.68~1.57
含歯性嚢胞	5	1.38±0.16	1.64~1.21
歯根嚢胞	5	1.45±0.21	1.64~1.14

表 4 各歯源性嚢胞の平均 PCNA 陽性率

組織型	症例数	平均値±S.D. (%)	範囲 (%)
歯源性角化嚢胞	5	20.3±10.3	32.0~8.5
含歯性嚢胞	5	11.7±9.9	26.7~1.9
歯根嚢胞	5	11.5±7.3	22.0~5.3

avidin Biotin) Kit を用いて行った(表2)。PCNA 陽性率は、800 倍顕微鏡下にて上記画像解析装置を用いて染色の強弱にかかわらず、わずかでも染色されていたものを陽性とみなし、その濃度値を記憶させ、それ以上のものを陽性細胞として細胞 500 個以上について計測し陽性率を求めた。

結 果

歯源性嚢胞の平均 Ag-NORs 数は、歯源性角化嚢胞では2.03±0.45個、含歯性嚢胞では1.38±0.16個、歯根嚢胞では1.45±0.21 個であった(表3)。歯源性角化嚢胞と含歯性嚢胞、歯根嚢胞の間には有意差(t-検定, P<0.05)を認めたが、含歯性嚢胞と歯根嚢胞の間に有意差はなかった(図1)。

PCNA の陽性率は、歯源性角化嚢胞では20.3±10.3%, 含歯性嚢胞では11.7±9.9%, 歯根嚢胞では11.5±7.3%となった(表4)。歯源性角化嚢胞と含歯性嚢胞、歯根嚢胞との間には有意差(t-検定, P<0.05)を認めたが、含歯性嚢胞と歯根嚢胞の間には有意差がなかった(図2)。また各歯源性嚢胞の Ag-NORs 数と PCNA 陽性率との関係は、統計学的な相関関係がみられず、同じ傾向を示すにとどまった。

歯源性角化嚢胞では5例中すべてが、内面に錯角化の重層扁平上皮の被覆をもっていた。Ag-NORs 顆粒, PCNA 陽性細胞ともに基底層よりも有棘層にかけて多くみられた(写真1, 2)。また上皮島のみられた嚢胞における上皮島上皮の Ag-NORs 顆粒, PCNA 陽性細胞ともに嚢胞上皮との間に有意差はみられなかった。

含歯性嚢胞は、比較的薄い非角化性重層扁平上皮の被覆を内面にもっていた。Ag-NORs 顆粒, PCNA 陽性細胞とも基底層から有棘層にかけて多くみられた(写真3, 4)。

図1 各歯原性嚢胞のAg-NORs数の比較

図2 各歯原性嚢胞のPCNA陽性率の比較

歯根嚢胞では5例中3例が内面に非角化性重層扁平上皮の被覆をもち、残りの2例は一部に錯角化を有していた。Ag-NORs顆粒、PCNA陽性細胞とも基底層から有棘層にかけてみられた(写真5, 6)。非角化性のものと錯角化性のものとの間にはAg-NORs数、PCNA陽性率ともに有意差はみられなかった。また炎症の程度とその染色性についても相関関係はみられなかった。

考 察

嚢胞とは生体の中には病的に形成された球状の囊状構造物で、その中に流動体あるいは半流動体、また、まれに気体を容れている。このうち、内面を上皮に裏装されたものを真性嚢胞、上皮のないものを偽嚢胞という^{14, 15)}。今回著者らは、顎骨に発生する真性嚢胞のうち歯原性嚢胞で発育性のものとして歯原性角化嚢胞および含菌性嚢胞を、炎症性のものとして歯根嚢胞を対象として、前記の染色法を用いて嚢胞上皮の増殖能について検索を行った。Ag-NORsは、ribosomal RNAを転写するDNAのloopで、このDNAがRNA polymerase Iによりribosomal RNA(r-RNA)に転写される¹⁶⁾。そして1980年にHowellら¹⁷⁾は、Ag-NORsを非常に簡便な改良鍍銀染色法により、通常の病理組織標本でもAg-NORs関連蛋白の検索を可能とした。しかしその機能についてはいまだ不明な点が多く問題点を残しているが、Ki 67陽性細胞数¹¹⁾、BrdU標識率¹⁸⁾ともよく相関するといわれている。Ag-NORs数の増加は細胞増殖活性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報告¹⁹⁾されている。これらよりその数は細胞の増殖、分裂能、ひいては生物学的悪性度を示す指標として皮膚¹⁾、乳腺^{2, 3)}、消化器^{4, 5)}、膀胱⁶⁾、造血器⁷⁾、肺^{8, 9)}などの腫瘍で、また最近では細胞診¹⁰⁾にも活用されてきており、Ag-NORs数の測定がその良悪の判定に有用と

記述されている。今回の検討でも歯原性角化嚢胞は含菌性嚢胞、歯根嚢胞に比して高値を示し、より細胞増殖が活発と推察された。また歯原性角化嚢胞は含菌性嚢胞、歯根嚢胞と若干異なり基底層よりも有棘層においてAg-NORs数が多い傾向にあり、基底層から基底層直上において増殖能を有している正常表皮²⁰⁾よりも細胞増殖活性部位が広がっていると考えられた。再発に深く関与しているといわれている上皮島、娘嚢胞の上皮については、嚢胞上皮と比してAg-NORs数に有意差が、認められなかった。

PCNAは、DNA複製に密接に関与し、細胞増殖に不可欠な物質であり、G₀期にはほとんど認められないが、G₁後期に核小体を中心に出現し、S早期には核全体に認められ、S後期以後には消失するといわれている²¹⁾。しかし最近ではG₁後期からS早期の細胞だけでなく、より広い範囲のcell cycle細胞であるという報告^{22, 23)}がなされている。また同一切片においても陽性細胞が多数検出される部位とわずかし検出されない部位が存在することが知られており、今回の検索でも計測する部位によるばらつきが多少みられることもあった。しかし、同一腫瘍組織内ではどの部分でも腫瘍細胞の性状が同じわけではないとの報告²⁴⁾もあり、今回の検索では、わずかでも染色されているものは陽性とみなして計測することによりばらつきを少なくした。歯原性角化嚢胞の陽性率は、含菌性嚢胞や歯根嚢胞に比し統計学的に有意差がみられ、歯原性角化嚢胞がほかの嚢胞よりも増殖活性が高いものと推察される。陽性細胞出現部位もAg-NORs数同様に、上皮島、娘嚢胞の上皮と嚢胞上皮については統計学的に有意差はみられなかった。歯原性角化嚢胞上皮では基底細胞よりも有棘細胞で陽性細胞が多くみられ、これは前述のごとく正常の表皮では基底

層、基底層直上の層でのみ増殖能があるが、歯原性角化嚢胞においては、正常な細胞動態のバランスが失われて基底細胞から有棘細胞までの広域で高い増殖能があるものと推察された。これらのことは、新谷ら²⁵⁾や篠塚ら²⁶⁾の報告とはほぼ同様な結果であった。また通常、嚢胞は残遺あるいは迷入した上皮が何らかの刺激によって塊状または索状に増殖し、これによって閉鎖された部分が栄養供給を断たれて液化壊死に陥り、浸透圧が関係して周囲から体液が流入し増大する²⁷⁾が、歯原性角化嚢胞ではそれに加えて嚢胞上皮自体に増殖能が存在しているものと推察される。この結果は臨床的にはかの顎骨嚢胞に比べて歯原性角化嚢胞は増大する傾向が強く、同一顎骨内に多発することがあり、また摘出後の再発が多いという性状²⁸⁾の一端を裏付ける所見と考えられる。

Ag-NORs, PCNA とともにホルマリン固定、パラフィン包埋された切片において染色が可能であり、近年増殖関連抗原の中でにわかに注目されている方法である。本研究での Ag-NORs 数と PCNA 陽性率の各歯原性嚢胞における比較では統計学的な相関関係はなかったものの、両方法を用いることにより嚢胞上皮の増殖活性を知り得るものと考えられる。

結 語

発育性、炎症性15例の顎骨嚢胞について Ag-NORs, PCNA の局在につき免疫組織化学的に検索し以下の結論を得た。

1. Ag-NORs について歯原性角化嚢胞上皮の細胞 500 個以上あたりの平均 Ag-NORs 数は、歯根嚢胞、含歯性嚢胞に比べて統計学的に有意差が認められ高い細胞増殖能を示唆した。

2. PCNA について歯原性角化嚢胞上皮の細胞 500 個以上あたりの平均陽性率は、歯根嚢胞、含歯性嚢胞に比べて統計学的に有意差が高いことを示した。

引 用 文 献

- 1) Egan, M.J. and Crocker, J.: Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *J Pathol* 154: 247-253 1988.
- 2) 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 growth phase by DNA flowcytometry. *J Pathol* 157: 307-313 1989.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) Rosa, J., Mehta, A., et al.: Nucleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor stages. *Histopathology* 16: 265-269 1990.
- 6) 竹内敏視: 膀胱腫瘍における核小体形成体の研究. *泌尿会誌* 81: 1711-1719 1990.
- 7) Crocker, J. and Nar, P.: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 151: 111-118 1987.
- 8) Crocker, J., Ayres, J., et al.: Nucleolar organizer regions in small cell carcinoma of the bronchus. *Thorax* 42: 972-975 1987.
- 9) 小倉滋明, 阿部庄作, 他: Nucleolar organizer regions からみた 気管支上皮異形成細胞と腺癌細胞の相違. *肺癌* 29: 771-776 1989.
- 10) 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.
- 11) Hall, P.A., Crocker, J., et al.: A comparison of nucleolar organizer regions staining and Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 12: 373-381 1988.
- 12) Robbins, B.A., de la Vega, D., et al.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 111: 841-845 1987.
- 13) Ploton, D., Menager, M., et al.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 18: 5-14 1986.
- 14) 山本浩嗣, 武田泰典, 他: 要説 口腔病変の組織診断. 永末書店, 京都, 1992, 40-41頁.
- 15) 山口和克訳: Zollinger 病理学. 第1版, 文光堂, 東京, 1989, 190-191頁.
- 16) Henderson, A.S., Warburton, D., et al.: Location of ribosomal DNA in the human chromosomal complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 3394-3398 1972.
- 17) Howell, W.M. and Black, D.A.: Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015 1980.
- 18) Tanaka, T., Takeuchi, T., et al.: Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylacetylamide in rats: Comparison with immunohistochemistry using a monoclonal antibody against bromodeoxyuridine. *Jpn J Cancer Res* 80: 1047-1051 1989.
- 19) 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.
- 20) 小川和朗, 小田琢三, 他: 細胞学大系 5 増殖と分化. 朝倉書店, 東京, 1971, 197-260頁.
- 21) Takasaki, Y., Deng, J., et al.: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation. *J Exp Med* 154: 1890-1909 1981.
- 22) Scott, R.J., Hall, P.A., et al.: A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 165: 173-178 1991.
- 23) 辻 龍雄, 佐々木功典, 他: 増殖細胞各抗原 (PCNA) の免疫組織染色における問題点. 日
口外誌 38: 1055-1058 1992.
- 24) Sasaki, K., Murakami, T., et al.: Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 68: 2403-2406 1992.
- 25) 新谷 悟, 多和伸介, 他: 歯原性角化嚢胞における抗 PCNA 抗体による細胞動態の解析(抄). 日本口腔科学会総会: 247 1992.
- 26) 篠塚和昭, 秋山 誠, 他: 歯原性角化嚢胞における抗 PCNA 抗体の研究 (抄). 日本口腔外科学会総会: 273 1992.
- 27) 竹内 宏, 金久純也, 他: 新編病理・口腔病理. 第1版, 学建書院, 東京, 1987, 227-233頁.
- 28) 石川悟郎, 秋吉正豊: 口腔病理学. 改訂版, 永末書店, 京都, 1984, 379-381頁.
-

写真 1 歯原性角化嚢胞 (Ag-NORs 染色, $\times 100$)

写真 2 歯原性角化嚢胞 (PCNA 染色, $\times 100$)

写真 3 含歯性嚢胞 (Ag-NORs 染色, $\times 100$)

写真 4 含歯性嚢胞 (PCNA 染色, $\times 100$)

写真 5 歯根嚢胞 (Ag-NORs 染色, $\times 100$)

写真 6 歯根嚢胞 (PCNA 染色, $\times 100$)