腺様嚢胞癌の臨床病理学的研究
——核 DNA 量解析と p53 蛋白, WAF 1 蛋白の免疫組織化学的検索——

前田 顕之

Clinicopathological study of adenoid cystic carcinoma
—— Nuclear DNA content and immunohistochemical analyses of
p53 and WAF 1 proteins ——

Akiyuki MAEDA

Abstract: Adenoid cystic carcinoma (ACC) is generally classified into the following histologic types: tubular, cribriform, and solid. Numerous authors have attempted to correlate the histological characteristics of these tumors with their biological behavior.

I retrospectively compared the image cytometric and immunohistochemical characteristics of formaldehyde-fixed and paraffin-embedded specimens obtained from 24 cases. The specimens were also classified according to the histological grading system proposed by Szanto et al., the predominant pattern, and the presence or absence of solid components. The nuclear DNA content of ACC on image cytometric analysis and the immunohistochemical characteristics of p53 protein and WAF 1 protein were studied as compared with clinicopathological findings. The following results were obtained:

1) No correlation was found between the histological classification and clinicopathological findings. However, most patients with tumors characterized by solid components died of cancer-related causes.

2) Tumors with a solid histological pattern and those with distant metastasis were more often associated with DNA aneuploidy, and these tumors had elevated levels of mean DNA index and %-over 4c.

3) No correlation was found between histological classification and p53 or WAF 1 protein expression. Lymph node metastasis was present in seven carcinomas, none of which expressed WAF 1 protein.

4) Aneuploid carcinomas were related to p53 protein immunoreactivity. There were no relationship between DNA ploidy pattern and WAF 1 protein expression.

5) There was a strong correlation between p53 and WAF 1 protein expression and most tumors that expressed p53 protein did not express WAF 1 protein.

These results suggest that WAF 1 protein expression and image cytometric DNA analysis may be a useful index for assessing the malignant behavior of ACC. Although aneuploid tumors were associated with a solid histological pattern, there was no correlation between histological classification and p53 or WAF 1 protein expression.

Key words: adenoid cystic carcinoma (腺様嚢胞癌), nuclear DNA content (核 DNA 量), p53 (p53), WAF 1 (WAF 1)

緒 言

顎口腔領域に発生する腺様嚢胞癌は主に大唾液腺や小唾液腺由来の腫瘍であり、その発生頻度は悪性唾液腺腫瘍の数十%を占める¹⁾。一般的に本腫瘍の発育は緩慢であるが、神経、血管に沿って浸潤するという特徴を有しており、局所再発や遠隔転移を生ずる症例が多い²⁾。従来より、本腫瘍の悪性度の評価や予後の判定には、組織型に基づく臨床病理学的手法が多く用いられてきたが、充実性の組織型の割合が増加するほど予後が悪くなる傾向が著しいといわれている^{3~15)}。しかしながら、組織型は悪性度や予後と関連しないという報告もあり、明確にされているとはいえない^{16,17)}。

近年、発癌、癌の進展に関わる分子機構に関する研究が進むとともに、癌の悪性度を評価する目的で腫瘍細胞における核DNA量や癌遺伝子、癌抑制遺伝子など分子生物学的因子に関する研究も行われるようになってきた¹⁸⁾。

DNAは遺伝情報の担体で、細胞の増殖、分化に関与する重要な物質と考えられており、染色体分裂異常による核DNA量の変化をploidy patternとして評価することで、腫瘍の細胞生物学的悪性度が検討されている¹⁹⁾。またDNA ploidy patternの評価基準や分類方法は各研究者によって異なるので²⁰⁾、客観的にDNA量の変化を評価するために平均核DNA量(mean-DNA Index, 以下m-DI)や4倍体を超える細胞の出現率(以下%-over 4c)などが用いられている²¹⁾。

癌抑制遺伝子であるp53遺伝子は17番染色体短腕に存在し、多くのヒト癌でその異常が共通して認められる²²⁾。p53遺伝子産物であるp53蛋白は分子量53kDaの核内に存在するリン酸化蛋白で、遺伝子変異の有無により野生型と変異型とに分けられる。変異型p53蛋白は細胞の癌化および増殖に関与すると考えられているが、野生型に比べ半減期が著しく延長し、核内に蓄積するため免疫組織化学的に検出が可能であるものが多い^{23,24)}。

WAF1²⁵⁾(p21/Cip1²⁶⁾)蛋白は野生型p53蛋白により発現が誘導され、サイクリン依存性キナーゼに対し阻害活性を有し、細胞周期をG1期に停止させる機能を有すると考えられている²⁶⁾。仮にWAF1蛋白が誘導されなければ、細胞周期制御機構が作動せず、その結果、腫瘍の異常な増殖が生ずると推察される。悪性腫瘍患者の予後とWAF1蛋白との関連性については否定的な報告^{27~29)}が多いが、WAF1蛋白陽性例は陰性例に比べ予後が良いという報告³⁰⁾、やWAF1蛋白発現が悪性度の指標になるという報告³¹⁾もあり、統一した見解にはいたっていない。

本研究では腺様嚢胞癌の核DNA量解析やp53蛋白、

WAF1蛋白の免疫組織学的検索を行い、これらのDNA異常や蛋白の発現が悪性度の指標になりうるか否かについて検討した。さらにこれら因子相互の関連性についても検討を加えた。

研究対象および検索方法

1. 研究対象

1975年から1997年の22年間に、福岡歯科大学附属病院とその関連施設で腺様嚢胞癌と診断され、放射線治療や化学療法が施行されず、外科的に切除された24例を対象とした(表1)。

性別は男性9例、女性15例であり、年齢は38歳から78歳、平均59歳であった。原発部位は耳下腺3例、顎下腺3例、舌下腺8例、上顎洞2例、口蓋2例、頬粘膜3例、舌根部3例であるが、耳下腺および上顎洞のそれぞれ1例が再発症例であった。

TNM分類は1987年のUICC分類³²⁾を使用した。pT分類はpT1:4例、pT2:10例、pT3:7例、pT4:3例、pN分類はpN1:5例、pN2b:2例であった。所属リンパ節転移陽性例は24例中7例(29.2%)であった。

観察期間中に遠隔転移を認めたのは24例中10例(41.7%)で、いずれも肺転移をきたしたが、1例は肺および骨への転移症例であった。局所再発は24例中5例(20.8%)に認められた。

経過観察期間は治療開始日を基準点とし、1998年6月30日までとした。観察期間は最短1年3か月、最長10年4か月であり、平均4年10か月であった。観察期間中に腫瘍死した症例は24例中11例(45.8%)であった。

2. 病理組織学的検索方法

パラフィン包埋組織から厚さ4 μ mの連続切片を作製し、通法に従い脱パラフィン後、Hematoxylin-Eosin染色(以下H-E染色)を施した。個々の腫瘍は1984年にSzantoら⁵⁾が提唱したGrade分類に従い組織学的分類を行った。さらに優位組織型による分類、充実型胞巣の有無による分類についても検討を行った(表2)。

3. 核DNA量解析法

1) 細胞単離塗抹標本作製法

H-E染色標本にて腫瘍部を確認後、40 μ mの厚切り切片からメスにて腫瘍部を採取し、Hedleyら³³⁾の方法にしたがって細胞単離遊液を作製した。次いで、自動細胞収集装置; Auto SmearTM(サクラ精機社製)を用いてDNA Calibration SlideTM(Becton Dickinson社製)に伸展塗抹し標本作製した。このスライドグラスは、上端に一定の核DNA量に調整されたラット肝培養細胞が塗布されており、これをBacusら³⁴⁾の方法に準じて外部標準とした。

表 1 腺様嚢胞癌症例一覧

症例	性	年齢	原発部位	pT 分類	pN 分類	遠隔 転移の 有 無	局所 再発の 有 無	組織学的 Grade 分 類	優 位 組織型	充実型 嚢巢の 有 無	予 後	生存期間 および 観察期間
1	F	46	顎 下 腺	2	0	+	—	Ⅱ	篩 状 型	+	腫瘍死	9年3か月
2	M	44	顎 下 腺	2	1	+	+	Ⅲ	充 実 型	+	腫瘍死	1年5か月
3	M	64	顎 下 腺	2	0	—	—	Ⅰ	篩 状 型	—	生 存	9年7か月
4	F	38	耳 下 腺	2	0	—	—	Ⅱ	篩 状 型	—	生 存	5年10か月
5	F	63	舌 根	3	0	+	—	Ⅲ	充 実 型	+	腫瘍死	7年
6	F	67	舌 下 腺	2	0	—	—	Ⅱ	篩 状 型	—	生 存	1年5か月
7	M	61	舌 根	3	1	+	—	Ⅱ	篩 状 型	+	腫瘍死	8年4か月
8	F	78	舌 下 腺	3	0	—	—	Ⅱ	篩 状 型	—	生 存	2年1か月
9	F	70	耳 下 腺	3	0	+	—	Ⅲ	充 実 型	+	生 存	2年10か月
10	M	71	上 顎 洞	3	0	—	+	Ⅱ	篩 状 型	+	腫瘍死	3年3か月
11	F	75	頬 粘 膜	2	0	+	—	Ⅰ	管 状 型	—	腫瘍死	2年4か月
12	F	39	頬 粘 膜	1	0	—	—	Ⅲ	充 実 型	+	生 存	2年8か月
13	F	47	口 蓋	4	0	—	+	Ⅲ	充 実 型	+	腫瘍死	5年7か月
14	M	44	上顎洞*	4	1	—	+	Ⅱ	篩 状 型	+	腫瘍死	4年5か月
15	M	59	耳下腺*	2	2 b	+	—	Ⅲ	充 実 型	+	腫瘍死	8年
16	M	61	舌 下 腺	3	1	+	—	Ⅱ	篩 状 型	—	生 存	2年1か月
17	M	66	舌 下 腺	3	1	—	—	Ⅰ	篩 状 型	—	生 存	5年8か月
18	F	63	口 蓋	1	0	—	—	Ⅲ	充 実 型	+	生 存	5年5か月
19	F	61	舌 下 腺	2	0	—	—	Ⅰ	篩 状 型	—	生 存	5年1か月
20	F	54	舌 下 腺	2	0	+	+	Ⅰ	管 状 型	—	腫瘍死	9年11か月
21	M	54	舌 下 腺	2	2 b	+	—	Ⅲ	充 実 型	+	腫瘍死	10年4か月
22	F	61	頬 粘 膜	1	0	—	—	Ⅰ	篩 状 型	—	生 存	4年3か月
23	F	63	舌 根	4	0	—	—	Ⅱ	篩 状 型	+	生 存	2年
24	F	78	舌 下 腺	1	0	—	—	Ⅰ	管 状 型	—	生 存	1年3か月

*再発例

2) Feulgen 染色法

Feulgen 染色には Quantitative DNA Staining Kit™ (Becton Dickinson 社製) を使用した。親水処理した細胞単離標本を 5 N 塩酸と室温で60分間反応させて加水分解し、0.1N 塩酸に溶解した DNA 染色試薬により室温で60分間 Schiff 反応させ、0.05N 塩酸に溶解した DNA 洗浄試薬で30秒、5分、10分間と3回洗浄した。次いで1%塩酸アルコールにより5分間脱色を行い、エタノールで脱水、キシレンで透徹後封入した(写真1)。

3) 核DNA量の測定

解析には細胞イメージ分析装置、Image Cytometer (以下 ICM) : CAS200 Image Analysis System (Becton Dickinson 社製) の DNA 定量分析プログラムを使用し、顕微吸光測定法により400倍の検鏡下で核の Feulgen 吸光量を計測した。まず、DNA Calibration Slide™ (Becton Dickinson 社製) 上のラッ

ト肝細胞の核 DNA 量をそれぞれの標本で約20個測定した。G0/G1の2Cに相当する細胞の核 DNA 量を7.18 picogram, DNA index は1と設定し、腫瘍細胞を無作為に300個を測定、ヒストグラムを作成した。さらに測定した300個の細胞を用いて Korenaga ら²¹⁾の方法に準じ、m-DI ならびに%-over 4c の分析を行い DNA 量の変化を客観的に評価した。

4) DNA ploidy pattern の分類

DNA ploidy pattern は癌 DNA 研究会用語検討委員会報告²⁰⁾に従い、Diploid pattern (以下 Diploidy) と DNA Aneuploidy (以下 Aneuploidy) に大別した。すなわち、DNA ヒストグラムで単一の G0/G1 peak (stem line) を認め、diploid range にあるものを Diploidy、G0/G1 peak (stem line) が Diploidy 以外に存在するものを Aneuploidy と判定した。

表2 腺様嚢胞癌の組織学的分類

Grade I : tumors with tubular and cribriform areas but without solid components.
Grade II : cribriform tumors that were either pure or mixed with less than 30% of solid areas.
Grade III : tumors with a predominantly solid pattern.

(Szanto, P.T., Luna, M.A., et al. 1984)

4. 免疫組織化学的検討

1) 染色方法

p53, WAF1 蛋白の免疫組織化学的染色は、間接酵素抗体法である Labelled Streptavidin Biotin Method (LSAB 法) にて行い、UltraTek Polyvalent-HRP-DAB 染色キット™ (ScyTek 社製) を用いた。一次抗体は Novocastra 社製の抗ヒト p53 マウスモノクローナル抗体 (Clone DO-7) ³⁵⁾ を 80 倍希釈で使用した。また抗ヒト WAF1 マウスモノクローナル抗体 (Clone 4D10) ³⁶⁾ は 30 倍希釈で使用した。

4 μ m の薄切連続切片を通常に従い脱パラフィン後、親水処理し、WAF1 蛋白は抗原賦活処理を行った。すなわち、10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中に切片を浸し、オートクレーブにて 121℃, 1 気圧, 20 分間処理し徐冷した。次いで、3% 過酸化水素水により内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を 30 分間行い、ブロッキング試薬にて 5 分間非特異的反応を阻止し、それぞれの一次抗体を 4℃ で 12 時間反応させた。ビオチン標識二次抗体で 10 分間、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて 10 分間反応させて抗原をペルオキシダーゼで標識した。洗浄後、3', 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) にて発色させ水洗した後、ヘマトキシリンにて対比染色、脱水、透徹、封入した。

免疫染色中の反応は、一次抗体以外室温で行い、各染色手順間の洗浄は 0.1M リン酸緩衝液 pH7.4 (以下 PBS) にて行った。

陽性対照としては p53 蛋白は大腸癌を、WAF1 蛋白は Novocastra 社のご好意により提供を受けた肺扁平上皮癌を使用した。陰性対照には一次抗体の代わりに PBS を用い、その他の染色過程は同様に行った。発現の評価は顕微鏡下で代表的な視野を選び、陽性対照と同等の発色を呈している細胞が少数でもあれば陽性、発色を認めないものや不明瞭なものは陰性とした。

5. 統計学的解析

統計学的有意差の検定は χ^2 検定, あるいは Fisher の直接確率法, t 検定にて行い、危険率 5% 未満をもつ

写真1 Feulgen 染色像 (いずれも $\times 100$)

A: ラット肝培養細胞 B: 腺様嚢胞癌細胞

て有意とした。

結 果

1. 組織型分類について

組織学的 Grade 分類では、Grade I 7 例、Grade II 9 例、Grade III 8 例、優位組織型による分類では、管状型 3 例、篩状型 13 例、充実型 8 例であった。また腫瘍組織内に充実型胞巣を有する症例は 24 例中 13 例であった。Grade 分類や優位組織型による分類では、腫瘍径 (pT)、リンパ節転移 (pN)、遠隔転移、局所再発、予後などの臨床的諸因子に関して有意な関連は認められなかった。しかし、充実型胞巣を含む症例では、観察期間中に腫瘍死している症例が 13 例中 9 例 (69.2%) であり、充実型胞巣を含まない症例の 11 例中 2 例 (18.2%) に比して有意に多く認められた ($p=0.019$) (表 3)。

2. 核 DNA 量解析について

DNA ploidy pattern は、Diploidy が 24 例中 17 例 (70.8%)、Aneuploidy は 7 例 (29.2%) であった。24 例の m-DI は 1.42 ± 0.31 、%-over 4c は 10.59 ± 10.82 であった。各組織像と DNA ploidy pattern, m-DI, %-

表 3 組織像と臨床的諸因子との関連

	組織学的 Grade 分類				優位組織型による分類				充実型胞巣の有無による分類		
	I	II	III	p 値	管状型	篩状型	充実型	p 値	無	有	p 値
pT 1, 2	6	3	5	NS	3	6	5	NS	8	6	NS
pT 3, 4	1	6	3		0	7	3		3	7	
pN (－)	6	6	5	NS	3	9	5	NS	9	8	NS
pN (＋)	1	3	3		0	4	3		2	5	
遠隔転移 (－)	5	6	3	NS	1	10	3	NS	8	6	NS
遠隔転移 (＋)	2	3	5		2	3	5		3	7	
局所再発 (－)	6	7	6	NS	2	11	6	NS	10	9	NS
局所再発 (＋)	1	2	2		1	2	2		1	4	
生 存	5	5	3	NS	1	9	3	NS	9	4	p=0.019
腫 瘍 死	2	4	5		2	4	5		2	9	

NS : not significant

表 4 組織像と DNA ploidy pattern, m-DI, %-over 4 c との関連

	DNA ploidy pattern			m-DI		% -over 4 c	
	Diploidy	Aneuploidy	p 値	mean±SD	p 値	mean±SD	p 値
Grade I	7	0	p=0.001	1.26±0.46	p=0.01	6.25±3.74	p=0.008
Grade II	8	1		1.29±0.84		5.43±5.51	
Grade III	2	6		1.70±0.11		20.12±13.40	
管状型優位	3	0	p=0.001	1.33±0.12	p=0.002	6.22±4.25	p=0.002
篩状型優位	12	1		1.27±0.22		5.69±4.93	
充実型優位	2	6		1.70±0.31		20.12±13.40	
充実型を含まない症例	11	0	p=0.006	1.26±0.12	p=0.019	6.21±3.78	NS
充実型を含む症例	6	7		1.55±0.13		14.30±13.42	

NS : not significant

over 4 c との関連性は、Grade 分類や優位組織型による分類では、Diploidy は Grade I, II の症例や、管状型、篩状型の症例に多いのに対して、Aneuploidy は Grade III や充実型優位の症例に明らかに多く認められた (p=0.001)。充実性胞巣の有無による分類では Diploidy に充実型胞巣を含まない腫瘍が17例中11例 (64.7%) と高率であるのに対して、Aneuploidy を呈した 7 例はいずれも充実型を含む腫瘍であった (p=0.006)。

一方、m-DI は、Grade I, II に対し Grade III で明らかに高値であった (p=0.01)。充実型の m-DI は、管状型、篩状型に対して明らかに高く (p=0.002)、また充

実型を含む症例では含まない症例に比して有意に高値を示した (p=0.019)。

%-over 4 c の分析でも同様に、Grade I, II に対し Grade III では有意に高値を示した (p=0.008)。また、充実型の %-over 4 c は管状型、篩状型に比べ明らかに高値を示した (p=0.002) (表 4)。

核 DNA 量解析と臨床的諸因子との関連は、DNA ploidy pattern, m-DI, %-over 4 c のいずれも pT 因子や pN 因子との間に明らかな関連は認められなかった。しかし、遠隔転移症例では Diploidy に比して Aneuploidy が多く、m-DI が高い傾向にあり (p=0.052)、特に遠隔転移群の %-over 4 c は16.2±13.6であ

表5 核DNA量解析と臨床的諸因子との関連

	DNA ploidy pattern			m-DI		% -over 4 c	
	Diploidy	Aneuploidy	p 値	mean±SD	p 値	mean±SD	p 値
pT 1, 2	10	4	NS	1.41±0.30	NS	9.27±8.32	NS
pT 3, 4	7	3		1.42±0.35		12.46±13.88	
pN (-)	12	5	NS	1.45±0.33	NS	11.15±11.05	NS
pN (+)	5	2		1.34±0.28		9.24±10.97	
遠隔転移 (-)	12	2	NS	1.31±0.25	p=0.052	6.62±6.10	p=0.03
遠隔転移 (+)	5	5		1.56±0.35		16.15±13.67	
局所再発 (-)	14	5	NS	1.43±0.33	NS	11.37±11.53	NS
局所再発 (+)	3	2		1.39±0.25		7.65±7.84	
生 存	12	1	p=0.023	1.29±0.22	p=0.026	6.34±4.56	NS
腫 瘍 死	5	6		1.57±0.35		15.61±13.90	

NS : not significant

写真2 腺様嚢胞癌における p53蛋白の発現 (いずれも×100)
A : 大腸癌 (陽性対照) B : 管状型 C : 篩状型 D : 充実型

写真3 腺様嚢胞癌における WAF1 蛋白の発現 (いずれも $\times 100$)

A: 肺扁平上皮癌 (陽性対照) B: 管状型 C: 篩状型 D: 充実型

り、非転移群の 6.6 ± 6.1 に比して有意に高値を呈した ($p=0.03$). さらに腫瘍死の割合をみると、Diploidy の17例中5例 (29.4%) に比して Aneuploidy では7例中6例 (85.7%) と有意に多かった ($p=0.023$). また腫瘍死群の m-DI は生存群に比して有意に高値を呈した ($p=0.026$) (表5).

3. 免疫組織化学的検討

組織像と p53 蛋白, WAF1 蛋白発現の関連は, p53 蛋白はいずれの組織型にも発現を認め, 24例中11例 (45.8%) に検出された (写真2). 一方, WAF1 蛋白の発現は全組織型で24例中10例 (41.7%) に認められた (写真3). p53 蛋白発現は Grade III や充実型に多い傾向があるものの, 陽性細胞の局在に統計学的有意差は認められなかった. また WAF1 蛋白の陽性反応は, 管腔を形成している内側の細胞に多く発現し, 充実型を含む症例では少ない傾向にあったが, 明らかな有意差は認められなかった (表6).

臨床的諸因子との関連をみると, WAF1 蛋白とリンパ節転移の間に明らかな関連性が認められた (表7). すなわち, リンパ節転移陰性例では17例中10例が WAF1 蛋白陽性であったのに対して, リンパ節転移

陽性の7例はいずれも WAF1 蛋白陰性であった ($p=0.019$).

DNA ploidy pattern と p53 蛋白, WAF1 蛋白の関連は, p53 蛋白陽性例の割合は Diploidy では17例中5例 (29.4%), Aneuploidy では7例中6例 (85.7%) であり, Aneuploidy では Diploidy に比して p53 蛋白の発現率が有意に高かった ($p=0.023$). 一方, WAF1 蛋白の発現は Aneuploidy に低い傾向がみられたが, 統計学的有意差は認められなかった (表8).

p53 蛋白と WAF1 蛋白発現の関連をみると, p53 蛋白陽性では11例中9例 (81.8%) が WAF1 蛋白陰性であるのに対して, p53 蛋白陰性では WAF1 蛋白陽性が13例中8例 (61.5%) を占めており, 両群間に明らかな負の相関性が認められた ($p=0.047$) (表9).

考 察

腺様嚢胞癌に関する報告¹⁴⁾では, 男性に比べやや女性に多く, 好発年齢としては40歳から60歳で, 大唾液腺より小唾液腺に好発するといわれている. 局所再発率は, 33%¹³⁾ ~ 93%¹⁶⁾ と研究者によって若干異なる

表 6 組織像と p53 蛋白, WAF 1 蛋白発現との関連

	p53 蛋白			WAF 1 蛋白		
	陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値
Grade I	5	2	p=0.083	1	6	NS
Grade II	6	3		7	2	
Grade III	2	6		6	2	
管状型優位	2	1	p=0.083	0	3	NS
篩状型優位	9	4		8	5	
充実型優位	2	6		6	2	
充実型を含まない症例	8	3	NS	4	7	p=0.095
充実型を含む症例	5	8		10	3	

NS : not significant

表 7 p53 蛋白, WAF 1 蛋白発現と臨床的諸因子との関連

	p53 蛋白			WAF 1 蛋白		
	陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値
pT 1, 2	7	7	NS	7	7	NS
pT 3, 4	6	4		7	3	
pN (－)	11	6	NS	7	10	p=0.019
pN (＋)	2	5		7	0	
遠隔転移 (－)	10	4	NS	7	7	NS
遠隔転移 (＋)	3	7		7	3	
局所再発 (－)	10	9	NS	10	9	NS
局所再発 (＋)	3	2		4	1	
生存	9	4	NS	6	7	NS
腫瘍死	4	7		8	3	

NS : not significant

表 8 DNA ploidy pattern と p53 蛋白, WAF 1 蛋白との関連

	Diploidy	Aneuploidy	p 値
p53 蛋白陽性	5	6	p=0.023
p53 蛋白陰性	12	1	
WAF 1 蛋白陽性	9	1	NS
WAF 1 蛋白陰性	8	6	

NS : not significant

表 9 p53 蛋白と WAF 1 蛋白の関連

	WAF 1 蛋白陽性	WAF 1 蛋白陰性	p 値
p53 蛋白陽性	2	9	p=0.047
p53 蛋白陰性	8	5	

が、50%台^{9, 11)}、60%台^{3, 5, 17)}が多い。所属リンパ節転移については、剖検例では50%という報告³⁷⁾もあるが、非剖検例では20%前後の報告が大半のようである^{3, 8, 10, 11, 13, 16)}。遠隔転移率は、30%台～60%台の報告が多い^{7, 8, 10, 12, 15, 16)}。本研究における対象症例の臨床病理学所見は諸家と類似しており、ほぼ一般的な腺様嚢胞癌の特徴を有しているものと考えられるが、局所再発に関しては20.8%と諸家の報告より若干低率であった。領家ら¹¹⁾は腺様嚢胞癌のなかでも解剖学的に切除範囲が制限を受ける小唾液腺原発症例の局所再発率は大唾液腺由来の症例に比して高率であると報告している。本症例での局所再発率が低かった理由として、これらの予後不良な小唾液腺原発腫瘍の割合が少なかったことが影響しているものと推測された。

1991年に Seifert ら³⁸⁾により改訂された WHO の唾液腺腫瘍の病理組織分類では、腺様嚢胞癌は管状型、篩状型、充実型の3種類の組織型が記載されている。これらの組織型が単一腫瘍内に混在し、多彩な組織像を呈するため、個々の腫瘍の病理組織学的評価が困難なことが少なくない。Perzin ら⁴⁾および Szanto ら⁵⁾らは、それぞれの組織学的 Grade 分類を提唱し、Grade が高いものほど予後が悪い傾向にあると報告した。本研究では Szanto らの Grade 分類や優位組織型による評価を試みたが、腫瘍の悪性度や予後との間に関連性は認められなかった。しかし、充実性胞果を有する症例には腫瘍死をきたしたものが有意に多く、本腫瘍の悪性度が充実性胞果の有無によって規定されるという興味深い知見が得られた。

従来より胃癌、大腸癌をはじめ多くの固形癌で核 DNA 量解析が行われ、腫瘍の悪性度や予後との関連性が指摘されている^{21, 39)}。腺様嚢胞癌に関する諸家の報告⁴⁰⁻⁴⁵⁾をみると、DNA ploidy pattern は予後と関連するという報告が少なくなく、また充実性腫瘍は Aneuploidy を示すことが多い。本研究でも、Aneuploidy は充実性の組織像を呈する腫瘍に多くみられ、予後不良の傾向が認められた。一方、m-DI や %over 4c の分析でも DNA ploidy pattern と同様の結果が得られた。ICM を用いて m-DI を評価した報告は少ないが、平野ら⁴⁶⁾は、乳癌 T₁ 症例のリンパ節転移陽性例では陰性例より m-DI が高値を示したと述べ、安藤³⁹⁾は、大腸癌の肝転移群が非肝転移群に比べ、有意に m-DI が高値を示したと報告している。Korenaga ら²¹⁾は、胃癌で m-DI や %over 4c が細胞分裂指数と相関したことから、Aneuploidy 症例ほど細胞分裂能が高いことを明らかにした。これらの知見を考慮すると、核 DNA 量が高値を示す Grade III や充実性の腫瘍は Grade I, II や他の組織型のものに比べて増殖活性が高く、DNA 量の多寡すなわち Aneuploidy の存在が腺様嚢胞癌の悪性度の指標となりうる可能性が示唆された。しかしながら、組織型にかかわらずほとんど

の症例で Aneuploidy が認められたとする報告⁴²⁾も散見されるので、今後さらに詳細な研究を行う必要があると思われる。

次に免疫組織化学的手法による腺様嚢胞癌の p53 蛋白に関する研究をみると、その発現率は新谷ら⁴⁷⁾は18例中2例(11.1%)、文ら⁴⁸⁾は27例中5例(18.5%)、往西⁴⁹⁾は、24例中20例(83.3%)と報告している。このような p53 蛋白発現の差異については、抗体の種類や染色の評価法などの違いに起因するものと考えられる。一方、文ら⁴⁸⁾の報告ではいずれの組織型にも p53 蛋白の発現が認められたが、往西⁴⁹⁾によると篩状型に発現が顕著であった。また Papadaki らの分析⁵⁰⁾では p53 蛋白陽性例は14例中5例(35.7%)であり、そのうち4例(80.0%)が再発例であった。本研究では、p53 蛋白の発現率は45.8%であり、すべての組織型で発現が認められたが、転移、再発などの臨床的諸因子との関連性はみられなかった。

野生型 p53 蛋白は DNA の損傷によって発現が誘導され、細胞周期やアポトーシスを制御している。すなわち野生型 p53 蛋白により標的遺伝子の転写が活性化されると、細胞周期を停止することにより DNA の修復が行われるが、DNA の修復が不可能な場合にはアポトーシスを誘導し、また異常な細胞を排除する。変異型 p53 蛋白は野生型より細胞内半減期が長いため、細胞内に過剰蓄積し癌化に働く。したがって、変異型 p53 蛋白を有する癌腫では genomic instability が増加しており、それを DNA 全体としてみた場合、Aneuploidy としてとらえることが可能と考えられる。

免疫組織学的検索による p53 蛋白の発現と DNA ploidy pattern の関連をみると、Ishii ら⁵¹⁾は悪性唾液腺腫瘍で p53 蛋白陽性例の多くが Aneuploidy を呈することを報告した。Wilson ら⁵²⁾も頭頸部扁平上皮癌において同様の傾向を報告している。本研究でも Aneuploidy 症例に p53 蛋白陽性例が多く、またそれらの多くは、Grade III 症例や充実型を含む症例であった。したがって、腺様嚢胞癌の充実性腫瘍では p53 遺伝子異常により細胞周期制御機構が働かず、その結果 genomic instability が増加し、Aneuploidy を呈するものと考えられた。

一方、本研究においてリンパ節転移陽性例7例がすべて WAF1 蛋白陰性であったことは WAF1 蛋白のリンパ節転移に関する意義を考えるうえで注目に値する。また WAF1 蛋白と p53 蛋白の発現には明らかな負の相関が認められたことより、WAF1 蛋白陽性例ではむしろ増殖活性が低く、悪性度が低いと推察された。小川ら³¹⁾は胃癌のリンパ節転移陽性例は転移陰性例よりも WAF1 蛋白の発現が有意に少ないことを報告し、Elbendary ら⁵³⁾の卵巣癌の研究でも、WAF1 蛋白と p53 蛋白の発現に明らかな負の関連性を認められていることから、本研究の結果はこれらの報告を支

持するものとする。一般に p53 の標的遺伝子の産物である WAF 1 蛋白は細胞周期の負の調節因子であることが知られており⁵⁴⁾、これらの事実を考慮すると、腺様嚢胞癌においても WAF 1 蛋白の発現は細胞増殖やリンパ節転移の制御に関与している可能性が示唆された。

結 語

腺様嚢胞癌24例について、核 DNA 量解析、および p53 蛋白、WAF 1 蛋白の免疫組織化学的分析を行い、癌の悪性度や組織型、さらにこれら因子相互の関連性について検討した。

1. 組織学的 Grade 分類、優位組織型による分類では臨床的諸因子との関連性は認められなかったが、充実型胞巣を有する症例に腫瘍死が多く認められた。

2. 充実性の組織型や遠隔転移症例では Aneuploidy を示すことが多く、また m-DI ならびに %-over 4c は高値を示した。

3. 組織型と p53 蛋白、WAF 1 蛋白の発現の間に明らかな関連性は認められなかったが、リンパ節転移陽性例はいずれも WAF 1 蛋白陰性であった。

4. Aneuploidy を示す症例は p53 蛋白陽性が多くみられたが、WAF 1 蛋白と DNA ploidy pattern との関連性は明らかでなかった。

5. p53 蛋白と WAF 1 蛋白の発現様式には明らかな負の相関があり、p53 蛋白陽性例では WAF 1 蛋白陰性例が、また p53 蛋白陰性例では WAF 1 蛋白陽性例が有意に多くみられた。

以上のことより、核 DNA 量解析や WAF 1 蛋白の発現は腺様嚢胞癌の悪性度の指標となりうる可能性が示唆された。また充実性の組織型は Aneuploidy を示す症例が多かったが、p53 蛋白や WAF 1 蛋白は組織型に依存しないことが明らかにされた。

謝辞

稿を終えるに臨み、ご指導とご校閲を賜りました本学口腔外科学第2講座 本田武司教授に深甚なる感謝の意を表します。また、多大なるご指導とご教示を頂きました千葉県がんセンター頭頸科主任医長 小村健博士に深謝いたします。さらに、種々のご支援と貴重なるご助言を頂きました本学外科学講座 是永大輔教授、口腔細菌学講座 上西秀則教授、口腔解剖学第1講座 長門俊一教授に感謝を申し上げます。最後に本研究に際しご協力いただいた本学口腔外科学第2講座の教室員諸氏に感謝いたします。

引 用 文 献

1) Ellis, G.L. and Auclair, P.L.: Adenoid Cystic Carcinoma. Surgical Pathology of the Salivary Glands (Chap19). WB

Saunders, Philadelphia, 1991, p333-349.
 2) 小村 健, 武宮三三, 他: 顎下腺様嚢胞癌6例の検討. 日口外誌 38: 604-614 1992.
 3) Eby, L.S., Johnson, D.S., et al.: Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck. Cancer 29: 1160-1168 1972.
 4) Perzin, K.H., Gullane, P., et al.: Adenoid Cystic Carcinomas Arising in Salivary Glands. Cancer 42: 265-282 1978.
 5) Szanto, P.A., Luna, M.A., et al.: Histologic Grading of Adenoid Cystic Carcinoma of the Salivary Glands. Cancer 54: 1062-1069 1984.
 6) Chomette, G., Auriol, M., et al.: Adenoid Cystic Carcinoma of Minor Salivary Glands. Analysis of 86 Cases. Virchows Arch. [Pathol Anat.] 395: 289-301 1982.
 7) Matsuba, H.M., Thawley, S.E., et al.: Adenoid Cystic Carcinoma of Major and Minor Salivary Gland Origin. Laryngoscope 94: 1316-1318 1984.
 8) Morinaga, S., Nakajima, T., et al.: Histologic Factors Influencing Prognosis of Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck. Jpn J Clin Oncol 16: 29-40 1986.
 9) 西岡博之, 間島雄一, 他: 頭頸部 Adenoid Cystic Carcinoma 27例の臨床的検討. 癌の臨床 32: 861-867 1986.
 10) 松田耕策, 手島貞一: 頭頸部腺様嚢胞癌66例の臨床病理学的検討—予後因子について—. 日口外誌 40: 438-453 1994.
 11) 領家和男, 片岡 聡, 他: 唾液腺に発生した腺様嚢胞癌の臨床的, 病理組織学的検討—再発, リンパ節転移, 遠隔転移について—. 日口外誌 41: 36-45 1995.
 12) Huang, M.X., Sun, K.H., et al.: Factors influencing survival rate in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. Int J Oral Maxillo-fac Surg 26: 435-439 1997.
 13) 梅野博仁, 宮嶋義巳, 他: 頭頸部腺様嚢胞癌54例の臨床統計. 日耳鼻 100: 1442-1449 1997.
 14) 山本祐三, 坂 哲朗, 他: 腺様嚢胞癌の基礎と臨床. 耳鼻臨床 84: 1153-1166 1991.
 15) 熊埜御堂浩, 大野芳裕, 他: 頭頸部腺様嚢胞癌40症例の臨床的検討. 頭頸部腫瘍 22: 191-197 1996.
 16) Spiro, R.H., Huvos, A.G., et al.: Adenoid Cystic Carcinoma: Factors Influencing Survival. Am J Surg 138: 579-583 1979.
 17) Marsh, W.L. and Allen, S.A.: Adenoid Cystic Carcinoma. Biologic Behavior in 38 Patients. Cancer 43: 1463-1473 1979.
 18) 安井 弥, 田原榮一: 大腸癌分子病理診断の到達点. モダンメディア 44: 71-79 1998.
 19) 田川 泰, 富田正雄: 人癌における DNA 解析.

- 細胞 25: 500-504 1993.
- 20) 鈴木宏志, 木村 修, 他: 癌 DNA 研究会用語検討委員会報告. 癌の臨床 37: 1-3 1991.
 - 21) Korenaga, D., Saito, A., et al.: Cytophotometrically determined DNA content, mitotic activity, and lymph node metastasis in clinical gastric cancer. Surg 107: 262-267 1990.
 - 22) Levine, A.J., Momand, J., et al.: The p53 tumour suppressor gene. Nature 351: 453-456 1991.
 - 23) Nigro, J.M., Baker, S.J., et al.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature 342: 705-708 1989.
 - 24) 多田光宏, 池田 潤: p53変異がもたらす機能変化. 細胞工学 16: 512-517 1997.
 - 25) El-Deiry, W.S., Tokino, T., et al.: WAF 1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression. Cell 75: 817-825 1993.
 - 26) Harper, J.W., Adami, G.R., et al.: The p21 Cdk-Interacting Protein Cip 1 Is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases. Cell 75: 805-816 1993.
 - 27) 田村真司, 興田順一, 他: 上咽頭癌, 中咽頭癌における p53の発現と癌ウイルス, および p21発現の関連. 頭頸部腫瘍 23: 583-588 1997.
 - 28) Moskaluk, C.A., Heitmiller, R., et al.: p53 and p21^{WAF1/CIP1/SDI1} Gene Products in Barrett Esophagus and Adenocarcinoma of the Esophagus and Esophagogastric Junction. Hum. Pathol 27: 1211-1220 1996.
 - 29) Slebos, R.J.C., Baas, I.O., et al.: Clinical and pathological associations with p53 tumour-suppressor gene mutations and expression of p21^{WAF1/CIP1} in colorectal carcinoma. Br J Cancer 74: 165-171 1996.
 - 30) Ito, K., Sasano, H., et al.: Correlations Between p21 Expression and Clinicopathological Findings, p53 Gene and Protein Alterations, and Survival in Patients with Endometrial Carcinoma. J Pathol 183: 318-324 1997.
 - 31) 小川正文, 前田 清, 他: 胃癌組織における癌抑制遺伝子 p21^{WAF1}の発現に関する免疫組織化学的検討. 癌と化学療法 24 (補II): 292-295 1997.
 - 32) Hermanek, P. and Sobin, L.H.: TNM classification of malignant tumors. 4th ED, UICC International Union Against Cancer, Springer-Verlag, 1987, p30-32.
 - 33) Hedley, D.W., Friedlander, M.L., et al.: Method for Analysis of Cellular DNA Content of Paraffin-embedded Pathological Material Using Flow Cytometry. J Histochem Cytochem 31: 1333-1335 1983.
 - 34) Bacus, S.S., Bacus, J.W., et al.: HER-2/Neu Oncogene Expression and DNA Ploidy Analysis in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med 114: 164-169 1990.
 - 35) 石井 (奥野) 菜穂子: ヒト口腔扁平上皮癌における p53癌抑制遺伝子の発現の解析. 口病誌 60: 131-148 1993.
 - 36) Hayashi, H., Miyamoto, H., et al.: Analysis of p21^{Waf1/Cip1} expression in normal, premalignant, and malignant cells during the development of human lung adenocarcinoma. Am J Pathol 151: 461-470 1997.
 - 37) 佐藤方信, 野田三重子, 他: 日本病理剖検輯報に基づく唾液腺癌剖検例の統計的観察. 日口外誌 26: 691-699 1980.
 - 38) Seifert, G.: Histological Typing of Salivary Gland Tumors. 2nd Ed, Springer-Verlag, Berlin, 1991, p21-22.
 - 39) 安藤秀彦: イメージサイトメトリーを用いた細胞診検体での核 DNA 量測定. 病理と臨床 14: 1265-1270 1996.
 - 40) Luna, M.A., El-Naggar, A., et al.: Flow Cytometric DNA Content of Adenoid Cystic Carcinoma of Submandibular Gland. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 116: 1291-1296 1990.
 - 41) 坂 哲郎, 山本祐三, 他: 腺様嚢胞癌の増殖能に関する研究—核 DNA 量解析による組織型別増殖能の比較—. 日耳鼻 93: 931-937 1990.
 - 42) Eibling, D.E., Johnson, J.T., et al.: Flow Cytometric Evaluation of Adenoid Cystic Carcinoma: Correlation With Histologic Subtype and Survival. Am J Surg 162: 367-372 1991.
 - 43) Franzen, G., Nordgard, S., et al.: DNA Content in Adenoid Cystic Carcinomas. Head & Neck 17: 49-55 1995.
 - 44) Tytor, M., Gemryd, P., et al.: Adenoid Cystic Carcinoma: Significance of DNA Ploidy. Head & Neck 17: 319-327 1995.
 - 45) 四ッ屋博人, 熊谷茂宏, 他: 腺様嚢胞癌の臨床病理学的検討—組織像と核 DNA 量の関係を中心として—. 口科誌 37: 436-444 1988.
 - 46) 平野 隆, 鬼頭隆尚, 他: 乳癌 t₁ 症例における定量細胞化学的検討—核 DNA 量, PCNA/cyclin および HER-2/neu 蛋白を用いた解析—. J Jpn Soc Clin Cytol 34: 591-598 1992.
 - 47) 新谷 悟, 松村智弘, 他: 口腔領域悪性腫瘍における癌抑制遺伝子産物 p53の免疫組織化学的検索. 日口外誌 38: 1274-1279 1992.
 - 48) 文 樹民, 辻 龍雄, 他: 悪性唾液腺腫における p53蛋白の免疫組織化学的発現と病理組織学的因子との関連性について. 日口外誌 40: 495-

- 450 1994.
- 49) 往西良之：唾液腺の多形性腺腫と腺様嚢胞癌との比較研究－細胞増殖動態と p21ras および p53 の発現について－. 口科誌 44: 360-375 1995.
- 50) Papadakis, H., Finkelstein, S.D., et al: The Role of p53 Mutation and Protein Expression in Primary and Recurrent Adenoid Cystic Carcinoma. Hum Pathol 27: 567-572 1996.
- 51) Ishii, K. and Nakajima, T.: Evaluation of malignant grade of salivary gland tumors: Study by cytofluorometric nuclear DNA analysis, histochemistry for nucleolar organizer regions and immunohistochemistry for p53. Pathol int 44: 287-296 1994.
- 52) Wilson, G.D., Richman, P.I., et al.: p53 status of head and neck cancer: relation to biological characteristics and outcome of radiotherapy. Br. J. Cancer 71: 1248-1252 1995.
- 53) Elbendary, A.A., Cirisano, F.D., et al.: Relationship between p21 Expression and Mutation of the p53 Tumor Suppressor Gene in Normal and Malignant Ovarian Epithelial Cells. Clin Cancer Res 2: 1571-1575 1996.
- 54) 時野隆至：p53 の標的遺伝子－p21/Waf1 を中心として. 実験医学 13: 86-89 1995.
-