多形性腺腫の腫瘍細胞核 DNA 定量による 診断学的研究

——特に、組織パターンおよび臨床的悪性度と
核 DNA 量との相関について——

渡 辺 是 久

神奈川歯科大学病理学教室（指導：久田太郎教授）

〔受付：昭和57年3月20日〕

Diagnostic study of pleomorphic adenoma by analysis of nuclear DNA content of tumor cell

— Correlation between histological patterns and the degree of
clinical malignancy and nuclear DNA content —

Yoshihisa Watanabe

Department of Pathology, Kanagawa Dental College

82, Inaoka-cho, Yokosuka-shi, Kanagawa 238

(Director : Prof. Taro Hisada)

〔Accepted for publication : March 20, 1982〕

Key words: diagnosis / pleomorphic adenoma / feulgen DNA / cytofluorometry / salivary gland

Abstract: The nuclear DNA content of a tumor cell was determined by Feulgen cytofluorometry in 30 patients with pleomorphic adenoma to study the correlations between the nuclear DNA content and the histological types of the tumor, cellular atypia or clinical malignancy. Moreover, since a tumor histopathologically shows various aspects of proliferative changes, the histological patterns in the same tumor were also investigated using nuclear DNA content as an index. Tissue sections (10 μ) were used for investigation by histological patterns.

From the results, the following were considered :

1) Appearance of polyploid is the key factor for differentiating the patients with pleomorphic adenoma from those with potentiality of malignancy. The reason why proliferation of the pleomorphic adenoma is slow seems to be that the cells at G₁ phase are predominant and the cells at S, G₂, or M phase are very few.

2) Proliferation ability is more increased in the salivary-duct-derived epithelial tumor cells than in the myxoid areas (which involves myoepithelium), the chondroid areas, and the myoma-like areas.

3) Semi-malignant pleomorphic adenoma and malignant pleomorphic adenoma are characterized by a shift of the major mode to 3c or disappearance of a stem line, appearance of polyploid over 5% and an increase in the number of cells at S, G₂, or M phase along with a decrease in cells at G₁ phase. Therefore, even in pleomorphic adenoma with clinically benign findings, the appearance of

polyploid or an increase in the cells at S, G₂, or M phase (especially when the rate exceeds 50%) seem to suggest a possibility of malignancy.

緒 言

悪性腫瘍に認められる腫瘍細胞の染色体異常は、同時に染色体モードを反映して核 DNA 量の変異として出現することが明らかとなり¹⁻⁴⁾、また最近の測定装置の改良と相まって顕微分光測光法や蛍光顕微測光法⁵⁻⁷⁾による Feulgen 核 DNA 定量が、従来から行われてきた腫瘍の形態学的診断に加え、悪性度に関する客観的指標として多くの領域に応用されている⁸⁻²⁴⁾。しかし、核 DNA 量の面からみた唾液腺腫瘍の診断学的研究は少なく、Eneroth & Zetterberg¹⁴⁻¹⁶⁾や Kino, et al.^{17,18)}の報告があるにすぎない。

一方、唾液腺に原発する腺系腫瘍は他臓器に発生するものと比較して多彩な組織像を呈するものが多く、臨床的悪性度と病理組織学的診断との相関が明確に一致しない症例に遭遇することがしばしばある。特に、大小唾液腺に好発する多形性腺腫、所謂混合腫瘍は、基本的には良性腫瘍と考えられているにもかかわらず、術後再発や稀に悪性化する症例が認められ、一部に悪性化への potentiality を有するものが含まれている腫瘍として知られている。しかし、病理組織学的診断を含めて現在までいずれの検索方法でもその鑑別は極めて困難である。そこで、この悪性化への potentiality を有する多形性腺腫を明らかに鑑別する目的で、手術的に摘出された多形性腺腫30症例（準悪性多形性腺腫および悪性多形性腺腫を含む）の腫瘍細胞核 DNA 量を測定（Feulgen 核 DNA 蛍光顕微測光法、10 μ の組織切片レベル）し、本腫瘍の組織型や細胞異型からみた組織分化度或いは臨床的悪性度と核 DNA 量との間に段階的相関が認められるか否かについて検索を行った。また、本腫瘍は病理組織学的に種々の variation を認め、唾液腺管由来の腺上皮性腫瘍細胞成分から筋上皮細胞の関与が示唆されている粘液腫様部或いは軟骨様組織の形成、筋上皮腫様構造、cylindromatous (cribriform) pattern に至る組織パターンの混在を特徴としている。従って、これら組織パターン

による悪性化への可能性の差異についても検討するため、同一腫瘍組織内における各種組織パターン別腫瘍細胞集団の増殖動態について検索し興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 検索症例

検索した症例は神奈川歯科大学口腔外科並びに静岡赤十字病院耳鼻科において生検或いは手術的に摘出された多形性腺腫30症例 (Fig. 1) である。原発巣は30例中18例が耳下腺で最も多く、次いで口蓋 (8例)、顎下腺 (2例)、口唇 (1例)、上顎洞 (1例) の順である。

2. 検索方法

i) 光顕の検索および核 DNA 定量法

材料は採取或いは摘出後全割し、各々10%中性緩衝ホルマリンにて24時間固定、通法に従ってパラフィン包埋、10 μ の薄切切片を作製し、藤田・福田法に従って定量的 Feulgen 染色を行った。Feulgen 染色は全症例ともに同一条件下で厳密に行った。また、Feulgen 染色用の切片と連続して3~5 μ の切片を作製し、Haematoxylin-Eosin 標本として光顕の検索を行うと同時に測定部位の確認に用いた。核 DNA 量の測定は1症例につき同一切片内で組織パターン別に2ないし3ヶ所各100個ずつ行い、測定した各組織パターン別に核 DNA 量ヒストグラムを作製して検討すると共に各症例ごとに全腫瘍細胞核 DNA 量ヒストグラム (以下 total histogram) についても検討を行った。2倍体 (2c) の設定には同一切片内にある正常唾液腺腺房細胞を約20個測定し、この核 DNA 量平均値を用いた。さらに各症例、各組織パターン別にこの核 DNA 量ヒストグラムを基に細胞分裂周期別細胞比率 (GoG₁ 期 : 2.5c 以下, S 期 : 2.6c ~ 3.9c, G₂ M 期 : 4c ~ 7.9c)、8倍体以上の核 DNA 量を有する高倍体の出現率を求め良性悪性の鑑別、悪性化への potentiality の有無と組織パターンとの相関について検討した。

測光装置および測光条件

No.	Case	Age	Sex	Tumor Location	Size cm	Growth	Histology
1	44-806 44-809	18	F.	Parotid gland Submandibular gland	1.2×1 0.3×0.2	Multiple	Semimalignant Pleomorphic adenoma
2	49-361	35	F.	Parotid gland	2.8×1.6	Expansive	Pleomorphic adenoma
3	49-1076	23	M.	Parotid gland	2.2×2.8	Expansive	Pleomorphic adenoma
4	49-1195	31	F.	Parotid gland	2.6×3.6	Expansive	Pleomorphic adenoma
5	49-1556	40	F.	Parotid gland	1.9×1.8	Expansive	Pleomorphic adenoma
6	49-2288	37	F.	Parotid gland	0.6×0.8	Expansive	Pleomorphic adenoma
7	49-2740	66	F.	Labium	0.8×0.9	Expansive	Pleomorphic adenoma
8	50-423	32	F.	Parotid gland	1.0×1.0	Expansive	Pleomorphic adenoma
9	50-867	43	M.	Submandibular gland	2.6×1.2	Expansive	Pleomorphic adenoma
10	54-109	35	F.	Parotid gland	3.1×2.3	Expansive	Pleomorphic adenoma
11	55-547	28	F.	Parotid gland	1.2×1.3	Expansive	Pleomorphic adenoma
12	55-629	44	M.	Parotid gland	1.5×2.8	Expansive	Pleomorphic adenoma
13	55-947	63	M.	Parotid gland	0.8×1.2	Expansive	Pleomorphic adenoma
14	55-2121	31	F.	Parotid gland	3.2×2.1	Expansive	Pleomorphic adenoma
15	55-2360	29	M.	Parotid gland	1.8×1.3	Expansive	Pleomorphic adenoma
16	56-341	39	M.	Parotid gland	1.7×1.6	Expansive	Pleomorphic adenoma
17	7027	45	M.	Parotid gland	2.1×1.6	Expansive	Pleomorphic adenoma
18	7977	37	M.	Parotid gland	2.5×1.8	Expansive	Pleomorphic adenoma
19	891	58	F.	Parotid gland	1.3×1.5	Expansive	Pleomorphic adenoma
20	987	18	F.	Palate	1.2×0.9	Expansive	Pleomorphic adenoma
21	994	32	F.	Palate	1.2×1.3	Expansive	Pleomorphic adenoma
22	1117	43	M.	Parotid gland	1.4×0.9	Expansive	Pleomorphic adenoma
23	1213	73	F.	Palate	1.3×1.8	Expansive	Pleomorphic adenoma
24	1443 1498	34	F.	Palate	0.8×1.2	Infiltrative	Semimalignant Pleomorphic adenoma
25	1468 1486	85	F.	Palate	1.5×0.8	Infiltrative	Semimalignant Pleomorphic adenoma
26	1716 1777	64	M.	Maxilla (Gingiva)		Infiltrative	Malignant Pleomorphic adenoma
27	1810 1825	40	F.	Palate	2.6×1.5	Infiltrative	Semimalignant Pleomorphic adenoma
28	1828	24	M.	Parotid gland	3.7×2.3	Expansive	Pleomorphic adenoma
29	1892	69	F.	Palate	1.0×0.7	Expansive	Pleomorphic adenoma
30	1901	72	F.	Palate	1.5×2.7	Expansive	Pleomorphic adenoma

Fig. 1 Reported Cases of Pleomorphic Adenoma in Salivary Gland.

今回, Feulgen 核 DNA 量の測定に用いたオリンパス MMSP-RF-KS 型落射顕微蛍光測光システム (Fig. 2) は従来使用されてきたオリンパス・マルチ測光顕微鏡 (MMSP) の落射顕微蛍光測光システム (MMSP-RF) と Optical Multi-channel Analyser (OMA) を組合せ, 顕微鏡試料の蛍光分光測光を1/30秒という短時間で350nm から700nm までスキャンニングし, calculator (YHP9825A) を用いてデータ処理を行い測光誤差をできるだけ小範囲にとどめた。Feulgen 核

DNA 量の測定の場合, 測光系に関する概略は Hg-lamp から出た励起光が励起光分光器 monochromator で546nm の単色光に分光固定される。試料測光路の光は pin hole を通り, halfmirror で反射し, 対物レンズを介して試料を励起する。reference 光路の励起光は reference 検出器に入り励起光強度を測定する。一方, 試料より出た蛍光は対物レンズ, halfmirror, barrier filter, diaphragm を通り, OMA 分光器に入り, OMA 検出波長即ち, Feulgen 核 DNA 蛍光の場合612

Fig. 2 A total system for quantitative fluorescence microscopy (OLYMPUS model MMSP-RF-KS type)

nm で固定され、この蛍光強度を測定、calculator に読み込ませ、あらかじめ reference 検出器から calculator に読み込まれていた励起光強度で補正してデータとしている。

Photo. 1 は顎下腺腺房細胞 (case 1) の Feulgen 核 DNA 蛍光と、pin hole 内に細胞核 1 個を固定し、測光系に光路を変更する直前の状態である。同様に腫瘍細胞の測定にあたっては対物レンズは 100 倍の油浸レンズを一定して使用、測光面積は各腫瘍細胞の大きさに合わせて最大 25μ 直径の面積内におさまるような pin hole の選定を行った。Fig. 3 は藤田・福田法に従って染色した定量的 Pararosanilin Feulgen 染色試料 (Photo. 1) に 546nm の緑色光の照射をすることによって得られた蛍光波長で、そのピークは 612nm にあり、この最大蛍光波長の蛍光量を Feulgen 核 DNA 量として測定した。

ii) 電子顕微鏡的検索

電顕試料は摘出時新鮮材料より 10 数か所にわたって小組織片を採取、2.5% glutaraldehyde (0.1 M. phosphate buffer, pH 7.2) にて前固定、続いて 1% osmic acid で後固定したのち、通法に

Fig. 3 Spectrum of nuclear Feulgen DNA fluorescence

従って alcohol 脱水し、Epon 812 に包埋した。超薄切片作製後ウラン・鉛の二重染色を行い JEM 100B 透下型電子顕微鏡にて観察した。

研究結果

1. 臨床および光顕の所見

Photo. 1 Nuclear Feulgen DNA fluorescence of normal salivary gland cells (acinous cells of submandibular gland, Case 1).

良性悪性を含め多形性腺腫の病理組織学的診断は腫瘍組織内の実質細胞の増殖と共に粘液腫様或いは粘液軟骨腫様部、所謂間葉系組織成分を混在することを基準とした。30例中小葉構造が著明で、充実性腫瘍細胞巢の増殖を主体とした充実型は16例 (case 2, 4, 9, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30), 上皮性腺管構造と一部索状配列を示す実質性腫瘍細胞巢を多く認めた腺腫型が8例 (case 5, 6, 7, 8, 16, 18, 22, 28) また腫瘍組織のほとんどが粘液腫様組織で占められる粘液腫型 myxoid pleomorphic adenoma が5例 (case 1, 3, 10, 11, 17) であった。

30例中25例の多形性腺腫は不完全ながら被膜形成が認められ, expansive な増殖を示し, 現在まで術後再発もなく良性と診断された症例で, その原発巣は耳下腺18例, 口蓋4例, 顎下腺, 口唇が各1例であった。また組織型は充実型12例, 腺腫型8例, 粘液腫型4例であった。case 2, 13, 15,

20, 29の5症例は間質の硝子化とわずかな粘液腫様組織を混在するが, 実質細胞の充実性増殖が顕著な症例で, 特に case 15では実質細胞の充実性増殖中心部に軟骨様組織の形成をともなう硝子化がみられ, 小範囲の壊死巣を認めた。また case 9は円柱状の硝子化が著しく, その硝子様物質の周囲或いは硝子様物質にそって腫瘍細胞が配列するが, その増殖は弱く一部に変性消失傾向が認められた。以上6症例は実質細胞を中心に核 DNA 量を測定し total histogram および細胞分裂周期別比率 (Fig. 4, 14) として表わした。case 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 16, 18, 19, 22, 23, 28, 30の15症例は充実性シート状配列 (Photo. 2) から索状配列 (Photo. 4), 腺腔形成の著しい部位 (Photo. 3) にいたる実質細胞の増殖と粘液腫様部 (Photo. 5), 粘液軟骨腫様部, 明らかな軟骨様組織の形成 (Photo. 6) さらには紡錘形細胞の増殖から成る筋上皮腫様構造 (Photo. 7), cribriform pattern を含む円柱腫様構造まで種々の組合せで一腫瘍組織内に認められ, 前述したごとく測光視野で明瞭に鑑別できる2ないし3ヶ所について各症例組織パターン別に核 DNA 量を測定し検討した (Fig. 5, 6, 7, 14, 15)。さらに case 6, 7, 17, 21の4症例は管腔を囲む円柱状或いは多角形の腺上皮腫瘍細胞とその周囲に増殖離開する紡錘形の筋上皮型腫瘍細胞との鑑別が明瞭であり, この両腫瘍細胞の核 DNA 量を各々測定し, 両者の核 DNA 量 histogram および細胞分裂周期別比率で検討を行った (Fig. 8)。case 6は腺腔を形成する上皮性腫瘍細胞の充実性増殖とこれに移行する形で密な筋上皮細胞に類似した紡錘形細胞の増殖がみられた。case 7および21は好酸性細胞質を有する円柱状の上皮性腫瘍細胞の腺管形成とその周囲に間質と接する形で同様の紡錘形細胞の増殖が著しく, 特に case 7では腺上皮性腫瘍細胞, 筋上皮細胞類似の紡錘形細胞共に大型不整核をもつ異型細胞が散在して認められた (Photo. 8)。case 17も粘液腫様組織内に腺管構造をとる上皮性実質細胞の小集簇が散在し, この腺管周囲から紡錘形細胞が多数離開して粘液腫様間質内へ移行する (Photo. 9)。この粘液腫様組織内或いは腺管周囲から粘液腫様部への移行部には多染性で大型の核

を持つ異型細胞をわずかに認めた。

準悪性多形性腺腫と診断された4症例 (Fig. 1) は硬口蓋小唾液腺に原発した3例 (case 24, 25, 27) と左耳下腺から顎下部にかけて多発性腫瘤として発生し、摘出後2回2年間にわたって再発をくり返した1例 (case 1) である。硬口蓋原発の3症例は組織学的にいずれも被膜形成がなく、粘膜下結合織内への浸潤がみられた。特に case 25 では口蓋骨の吸収 (骨組織内への連続浸潤はない) が著しく、腫瘍表面の口蓋粘膜には凹凸が顕著で中心部には出血をとまなう潰瘍形成を認めた。case 24および27の2症例では円柱状或いは多角形の腺房細胞に類似した比較的大型淡明な細胞質を持つ腫瘍細胞の充実性増殖と腫瘍細胞巢間に Toluidine blue (pH 4.1) 染色で Metachromasia を呈する粘液腫様間質組織の形成がみられたが、case 27の腫瘍細胞がほぼ均一な円形核であるのに対し、case 24では核の大小不同、核縁の不整、不均一なクロマチンパターン、核小体の明瞭化等比較的高度な異型性が認められた (Photo. 10)。case 25は潰瘍底部から辺縁部の硝子化した間質内に索状配列、一部小腺管を形成する小型実色性腫瘍細胞巢が浸潤し、これらの腫瘍細胞巢内には大型不整核を持つ異型細胞が散在性に、また一部2~3個集簇してみられた (Photo. 11)。case 1は耳下腺および周囲脂肪織内に粘液腫様或いは軟骨粘液腫様組織を主体とした大小多数の satellite nodule の形成がみられ、顎下腺組織内にも3個の同様な nodule の形成が認められた。個々の nodule は被膜形成が完全で腫瘍細胞の周囲組織内への infiltration はないが、これら nodule 内粘液腫様組織にみられる腫瘍細胞は核の多染性が強く、上皮真珠を形成する扁平上皮化生が散見された。

明らかな浸潤癌の型を呈した悪性多形性腺腫 (case 26) は上顎洞に原発、上顎骨にそって浸潤し、鼻腔粘膜下および右上顎側肉に腫脹を来した症例である (Fig. 1)。組織学的には多染色不整核で細胞質の不明瞭な腫瘍細胞の充実性増殖内に大小の腺腔構造を認める cylindromatous (cribriform) structure (Photo. 12)と、これに連続して粘液腫様組織を形成、この粘液腫様部内には

は異常核分裂像を示す大型の異型細胞 (Photo. 13) や著明な異型性をともなう扁平上皮化生が散在してみられた。また一部に小型の充実性癌細胞巢の浸潤もみた。核 DNA 量の測定にあたっては生検材料 (歯肉浸潤部) と共に、特に手術材料を各部位別 (歯肉、鼻腔、上顎洞) 別に、さらには各部位に認められた組織パターン別に検討した (Fig. 7, 11, 12, 14, 15)。

2. 電子顕微鏡的所見

case 11と case 17の2症例について電顕的観察を行った。Toluidine blue 染色を行った Epon semithin section の光顕像では両症例ともほぼ同様で粘液腫様組織が主体をなし、中心に大小の腺管を形成する腫瘍細胞の集簇が散見された。この腫瘍細胞巢の管腔側は一層の立方状ないし円柱状細胞より成り、これに連続した周辺部の細胞は多核形で、さらに基底側部の細胞は紡錘形で細胞相互の離開が著しい所見を呈していた。

電顕的に、腺管の内腔に位置する細胞は核小体の不明瞭な不整楕円形核で、細胞内小器官に乏しいが細胞質内には大小様々な分泌顆粒を多数含有し、管腔側の細胞膜には多数の microvilli をみる腺細胞類似の構造を示した (Photo. 14)。また核周囲や顆粒間には R-ER が認められた。この明らかに上皮性腺細胞と類似した細胞の周辺には、細胞質内に核と平行し、細胞の長軸方向に走向する束状の tonofilament を認める扁平上皮類似細胞が最大数層にわたってみられた (Photo. 15)。基底側の細胞は細胞相互の離開が著しく、基底膜の断列消失が認められた。離開した細胞中には細胞質内に微細な myofilament が錯走する筋上皮型細胞が観察された (Photo. 17)。また、筋上皮型細胞の細胞質内には myofilamentous bundle が充満する他、少数の小管状 R-ER と細胞膜に近接して少数の mitochondria が観察された (Photo. 17)。両症例の粘液腫様部にはよく発達した filamentous bundle を含む筋上皮型細胞の存在を多数確認した (Photo. 16)。

3. 多形性腺腫の核 DNA 量

1) 良性多形性腺腫

Fig. 4 は良性多形性腺腫6例 (case 5, 9, 13, 15, 20, 29) の核 DNA 量 total histogram と腫

Fig. 4 Total histograms of 6 cases of benign pleomorphic adenoma and the rate of tumor cells by cell division (cytokinesis) periods in each case.

瘍細胞の分裂周期別細胞比率を表わしたものである (Fig. 4)。6 症例共に 2 倍体域に顕著な mode を有する単峰性のヒストグラムパターンを示し、瘍細胞の stem line はいずれも 2 倍体に認められた。6 症例中 5 症例 (case 5, 13, 15, 20, 29) に 4 倍体領域の瘍細胞 (G_2 から M 期に相当) の出現が最小 0.5% (case 13) から最高 8% (case 15), 平均 5.6% みられた。8 倍体以上の核 DNA 量を示す高倍体は case 15 のみに 1% 認められた。また case 9 では 4 倍体以上の核 DNA 量を含む

瘍細胞の出現はみられなかった。これら 6 症例の G_0G_1 期に相当する瘍細胞は最小 70.5% (case 5) から最高 91% (case 9), 平均 81.8% と多数を占め, S 期に相当する瘍細胞は最小 7% (case 29) から最高 23.5% (case 5), 平均 13.5%, G_2M 期に相当する瘍細胞は平均 4.5% いずれも 7% 以下であった。

次いで Fig. 5 は良性多形性腺腫 15 例の核 DNA 量 total histogram と各症例同一瘍組織内に認められた各種組織パターン別瘍細胞核 DNA 量

Fig. 5 Total histograms of 15 cases of benign pleomorphic adenoma and histograms of each case by histological patterns.

Fig. 6 The rate of tumor cells by cell division (cytokinesis) periods in each case of 15 cases benign pleomorphic adenoma.

histogram である。total histogram では14例が2倍体に集束された単峰性ヒストグラムパターンを示し、その stem line はいずれも2倍体に認められたが、case 22の1例で高2倍体領域に major mode を認めた。4倍体以上の腫瘍細胞は15例全てにみられ、最小1% (case 2, 28) から最高12% (case 16)、平均6.5%であった。また15症例中8例、53%に6倍体領域の核 DNA 量を含む腫瘍細胞の出現がみられた。高倍体の出現は case 14に0.5%、case 19に1%認められ、いずれも8倍体領域の細胞であった。分裂周期別細胞比率 (Fig. 6, 14) では G_0G_1 期に相当する腫瘍細胞が最小67% (case 22, 23) から最高92.5% (case 2)、平均79.5%と多数を占めるのに対し、S期に相当する腫瘍細胞は最小5% (case 4) から最高23.5% (case 23)、平均14.8%、また G_2M 期に相当する腫瘍細胞は最小1% (case 28) から最高12% (case 16)、平均6.4%とその比率は比較的少い。組織パターンと核 DNA 量との相関 (Fig. 5, 8, 14, 15) をみると実質細胞からなる充実性増殖部 (case 3, 10, 14, 16, 18, 19, 23, 28) 或いは少数の腺管構造を含む充実性増殖部 solid tubular pattern (case 4, 8, 12)、腺管構造の顕著な部 (case 22, Photo. 18)、索状配列部 (case 2, 14, 16, 28, Photo. 19)、円柱腫様部 (case 22) およびこれらの構造が混在する部位 (case 30) の腫瘍

細胞は2倍体に major mode を持ち、これらの部位には全て4倍体領域の腫瘍細胞の出現がみられた。case 22の充実性増殖部と case 11および2の腺管構造を含む充実性増殖部ではその major mode が高2倍体に認められ、いずれも4倍体領域の腫瘍細胞の出現がみられた。また case 16の索状配列部では低2倍体領域にその major mode を認めた。高倍体の出現部位は case 14では索状配列部に1%、case 19では充実性増殖部で2%の割合で各々認めた。一方、所謂間葉系組織成分である軟骨様部 (case 3, 4, 12)、粘液軟骨腫様部 (case 18, 28)、粘液腫様部 (case 11, 30) ではその major mode が低2倍体領域にみられたが、case 3, 4, 8, 14, 23の粘液腫様部 (Photo. 20, 21) および case 19の粘液軟骨腫瘍部では2倍体に、また case 12の粘液腫様部のみ高2倍体にその major mode を認めた。4倍体以上の核 DNA 量を含む腫瘍細胞の出現は軟骨様部では3例中1例 (case 12) 30%、粘液軟骨腫様部では3例中2例 (case 18, 19) 60%、粘液腫様部では7例中6例 (case 3, 8, 11, 14, 23, 30) 86%に認められた。高倍体の出現は軟骨様部、粘液軟骨腫瘍部、粘液腫様部のいずれにも認められなかった。筋上皮腫様 (平滑筋腫様) 構造部 (case 2, 18, Photo. 21) では紡錘形腫瘍細胞の増殖軽度な case 2で major mode が低2倍体領域に認められ、4倍体以上の

Fig. 7 The rate of tumor cells by cell division (cytokinesis) periods in each histological pattern of all cases.

腫瘍細胞の出現はなかったが、充実性増殖部から移行する形で密な同腫瘍細胞の増殖がみられた case 18ではその major mode は2倍体に、4倍体以上の腫瘍細胞が5%みられた。これら組織パターン別に腫瘍細胞の分裂周期別細胞比率 (Fig. 7, 15) をみると、充実性増殖部では G₀G₁ 期に相当する細胞が最小44.5% (case 22) から最高87% (case 28), 平均70.6%と比較的低値を示す症例を認めた。これに対比してS期に相当する細胞は最小10.5% (case 19) から最高37.5% (case 22), 平均19.1%, G₂M 期に相当する細胞は最小2% (case 28) から最高17% (case 22), 平均10%と比較的多数を占める症例が認められた。このシート状充実性増殖部に比較して腺管形成部、索状配列部、円柱腫様部では G₀G₁ 期に相当する細

胞が各々最小59.5% (case 4) から最高96% (case 16) 平均78.1%, 最小72.5% (case 16) から最高93% (case 2) 平均81.3%, 最小84.5% (case 22) から最高91% (case 9) 平均87.8%と高率で、S期に相当する細胞は各々最小4% (case 16) から最高29.5% (case 22) 平均17.9%, 最小4% (case 2) から最高16.5% (case 16) 平均12%, 最小9% (case 9) から最高10.5% (case 22) 平均9.8%および G₂M 期に相当する細胞は各々最小0% (case 16, 28) から最高13.5% (case 4) 平均4.6%, 最小3% (case 2) から最高11% (case 16) 平均6.3%, 最小0% (case 9) から最高5% (case 22) 平均2.5%と低率であった。同様に間葉系組織内の腫瘍細胞でも、粘液腫様部で G₀G₁ 期に相当する細胞が最小52.5% (case 12) から最高91.5%

Fig. 8 Total histograms of 4 cases of benign pleomorphic adenoma and histograms of epithelial duct-like cells and neoplastic myoepithelial cells in each case. The rate of tumor cells by cell division (cytokinesis) periods in each case and tumor cell.

(case 11) 平均80.4%, S期に相当する細胞および G₂M 期に相当する細胞は各々最小5.5% (case 11) から最高30% (case 12) 平均12.9%, 最小0% (case 4) から最高17.5% (case 12) 平均6.6%と腫瘍細胞集団内に占める G₀G₁ 期の細胞が比較的少く, S期から G₂M 期の細胞が増加している症例 (case 12) がわずかに認められた。これと比較して粘液軟骨腫様部, 軟骨様部或いは筋上皮腫様 (平滑筋腫様) 部では G₀G₁ 期に相当する細胞が各々最小70% (case 19) から最高100% (case 28) 平均87.8%, 最小79% (case 12) から最高100% (case 4) 平均92%, 最小88% (case 18) から最高100% (case 2) 平均94%と高率であるのに対し, S期に相当する細胞は各々最小0% (case 28) から最高18% (case 19) 平均7.6%, 最小0%

(case 4) から最高12% (case 12) 平均5%, 最小0% (case 2) から最高7% (case 18) 平均3.5%および G₂M 期に相当する細胞は各々最小0% (case 28) から最高12% (case 19) 平均4.6%, 最小0% (case 3, 4) から最高9% (case 12) 平均3%, 最小0% (case 2) から最高5% (case 18) 平均2.5%と低値を示した。

さらに Fig. 8は腺上皮性実質細胞と筋上皮型細胞の鑑別が明瞭であった良性多形性腺腫4症例 (case 6, 7, 17, 21) の核 DNA 量 histogram と分裂周期別細胞比率である。4症例の total histogram はいずれも2倍体領域に major mode を有するヒストグラムパターンを示すが, case 17では4倍体領域にも小ピークをみるやや二峰性に近いパターンを示した。4倍体以上の腫瘍細胞の

Fig. 9 Histograms of 4 cases of semimalignant pleomorphic adenoma (biopsic and surgical materials) and histograms of normal submandibular cells (case 1).

出現は case 6 および 21 の各 8.5% に比較して、異型細胞を認めた case 7 では 20.5%，また case 17 でも 21% みられた。高倍体についても case 7 では 16 倍体領域の核 DNA 量を有する腫瘍細胞を含めて 7.5% と高率な出現をみた。case 17 でも 2% 認められた。分裂周期別細胞比率でも case 7 と case 17 で G_2M 期に相当する腫瘍細胞の増加を認めた。一方、Fig. 8 に示した各症例の腺上皮性腫瘍細胞、筋上皮型腫瘍細胞別 histogram でも両腫瘍細胞共全例 2 倍体領域に major mode を持つヒストグラムパターンを示した。case 17 では total histogram と同様両腫瘍細胞共に 4 倍体領域に小ピークを有するやや 2 峰性に近いヒストグラムパターンを示した。4 倍体以上の腫瘍細胞は case 6, 21 で腺上皮性腫瘍細胞、筋上皮型腫瘍細胞共に 10% 以下であったが、case 7, 17 ではいずれも 10% 以上で、腺上皮性腫瘍細胞は各々 30% (case 7), 17% (case 17), 筋上皮型腫瘍細胞は各々 11% (case 7), 21% (case 17) と比較的高率な出現をみた。

高倍体についても腺上皮性腫瘍細胞では case 7 で 13% と極めて高く、case 17 で 1.5%，筋上皮型腫瘍細胞では case 7 で 2%，case 17 で 1.5% 出現した。両腫瘍細胞を分裂周期別細胞比率 (Fig. 8) でみると、 G_0G_1 期に相当する腺上皮性腫瘍細胞は最小 59% (case 6) から最高 71.5% (case 21), 筋上皮型腫瘍細胞で最小 59.5% (case 17) から最高 71% (case 6), S 期に相当する腺上皮性腫瘍細胞は最小 9.5% (case 7) から最高 32% (case 6), 筋上皮型腫瘍細胞で最小 19.5% (case 17) から最高 25.5% (case 7, 21), G_2M 期に相当する腺上皮性腫瘍細胞は最小 9% (case 6) から最高 17% (case 7), 筋上皮型腫瘍細胞で最小 7.5% (case 21) から最高 19.5% (case 17) と腺上皮性腫瘍細胞はもちろん筋上皮型腫瘍細胞においても増殖傾向が認められた。

2) 準悪性多形性腺腫

準悪性多形性腺腫 4 症例の total histogram (Fig. 9) では case 24, 27 で生検材料、摘出材料

Fig. 10 The rate of tumor cells by cell division (cytokinesis) periods in each case of semimalignant pleomorphic adenomas

共に各々2倍体に、case 1で耳下腺および顎下腺内腫瘍共に高2倍体にmajor modeを示した。潰瘍形成と共に組織学的に腫瘍細胞に異型性が出現したcase 25の生検材料では3倍体に低いピークが出現し、幅広い分布を示した。また摘出材料でも一応2倍体にやや低いピークを有するものの3倍体領域に異数倍体性の核DNA量を含む腫瘍細胞がみられ、生検材料同様幅広い核DNA量分布が認められた。4倍体以上の腫瘍細胞はcase 24の生検材料、摘出材料各々29.5%、9.5%、case 27では8.5% (生検材料)、22% (摘出材料)と各々どちらか一方で20%以上を占めた。case 1では耳下腺部腫瘍細胞で22%、顎下腺内腫瘍細胞で11.5%であった。case 25では生検材料で33.5%、摘出材料で29%と双方共に高値を示した。高倍体の出現は1% (case 24の摘出材料、case 1の耳下腺内腫瘍細胞)から16.5% (case 24の摘出材料)まで4症例ともに認められ、その核DNA量も症例によって8倍体領域から16倍体領域まで幅広くみられた(Photo. 23, 24)。分裂周期別細胞比率 (Fig. 10)ではG₀G₁期に相当する腫瘍細胞が最小30.5

% (case 25の生検材料)から最高81.5% (case 24の摘出材料)で、特にcase 25では生検材料、摘出材料共に50%以下とその腫瘍細胞内に占める比率が低値を示した。S期に相当する腫瘍細胞は最小9% (case 24の摘出材料)から最高37.5% (case 1の顎下腺内腫瘍細胞)で、そのmajor modeを高2倍体に有するcase 1と共にcase 25でいずれも25%以上 (生検材料26%、摘出材料25.5%)を占め、腫瘍細胞集団内に占めるDNA合成期に相当する細胞の明らかな増加を認めた。G₂M期に相当する腫瘍細胞 (最小8.5%から最高27%)もcase 25でいずれも20%以上 (生検材料27%、摘出材料22%)みられ、本症例がpolyploidizationと共に高い増殖性を有することを示した。一方、対照として測定した正常顎下腺細胞の核DNA量 (Fig. 9)は2倍体領域に高いピークを示す単峰性のヒストグラムパターンで高倍体の出現は全く認められず、4倍体領域の核DNA量を有する細胞 (G₂M期に相当する細胞)も5%と低値であった。腺上皮細胞、筋上皮型細胞別でも腺房細胞は全て2倍体領域の細胞のみで占められ、また導管上皮

Fig. 11 Histograms of malignant pleomorphic adenoma in each surgical material and histological patterns (case 26)

細胞の G_2M 期に相当する細胞は7.5%，腺房あるいは介在部導管周囲に存在するそれぞれの筋上皮型細胞も6%から9%と腫瘍細胞集団と比較して明らかな低値を示した。

3) 悪性多形性腺腫

Fig. 11は case 26 (悪性多形性腺腫) の生検材料と手術的に摘出された各浸潤部位についての組織パターン別腫瘍細胞核 DNA 量 histogram である。cylindromatous (cribriform) pattern を主体とした生検材料 (右上顎歯肉浸潤部) ではその major mode が3倍体にみられ、8倍体領域の核 DNA 量を含む高倍体が2%認められた。また全摘出材料の total histogram では一応2倍体に小ピークを有するヒストグラムパターンを示すが16倍体領域の高倍体 (高倍体出現率は平均5.3%，

Photo. 25) を含めて極めて幅広い核 DNA 量分布がみられた。4倍体以上の腫瘍細胞は生検材料で38.5%，摘出材料で34%と高値であった。しかし、組織パターン別にそのヒストグラムパターンをみると充実性小型癌胞巣を形成する腫瘍細胞集団では2倍体に major mode を持つ単峰性パターンを示し、高倍体の出現もみられなかったのに対し、著明な異型細胞を認めた粘液腫様部では特定の major mode を示さず、極めて幅の広いパターンと16倍体領域を含む高倍体を16%と高率に認めた。さらに、cylindromatous (cribriform) pattern を呈した鼻腔浸潤部の摘出材料では生検材料と同様その major mode が3倍体にみられ高倍体 (8倍体領域) の出現も2%認められた。分裂周期別細胞比率 (Fig. 12, 14) でみると G_0G_1 期に相当する腫瘍細胞は生検材料で29.5%，摘出材料の total で44.5%といずれも全腫瘍細胞中に占める比率が50%以下であった。S期に相当する腫瘍細胞は生検材料で32%，摘出材料の total で20.5%， G_2M 期に相当する腫瘍細胞は各々36.5% (生検材料)，27.5% (摘出材料 total) で、DNA 合成期から分裂期にいたる腫瘍細胞の顕著な増加が認められた。組織パターン別には G_0G_1 期に相当する腫瘍細胞が、cylindromatous (cribriform) pattern で、生検材料、摘出材料の平均が37%，充実性小型癌胞巣部 (摘出材料) で79.5%，粘液腫様部で18%，S期に相当する腫瘍細胞は各々28% (cribriform pattern の平均)，16% (充実性小型癌胞巣部)，23.5% (粘液腫様部)， G_2M 期に相当する腫瘍細胞は各々32.5% (cribriform pattern の平均)，4.5% (充実性小型癌胞巣部)，42.5% (粘液腫様部) と各組織パターンによって大きな相違が認められた。

考 察

顕微分光光度計を用いた Feulgen 核 DNA の定量によって正常組織細胞の核 DNA 量が種によって異なるものの常に一定であり、また細胞分裂周期によって増加、倍化されること (Leuchtenberger²⁵⁾) が確められて以来、各種組織についての顕微分光測光法による核 DNA 量 (比較定量) 分布に関する研究が数多く報告されている⁸⁻²⁴⁾。

Fig. 12 The rate of tumor cells by cell division (cytokinesis) periods of malignant pleomorphic adenoma (biptic and surgical materials of case 26) and in each surgical material and histological pattern.

特に腫瘍細胞では正常細胞に比べ核 DNA 量が増加するという報告が多く^{8-10, 26-28)}, 悪性腫瘍細胞の細胞特性の一指標として核 DNA 量の面から良性悪性の判定, 臨床的悪性度との関連について検討がなされてきた。Pararosanilin Feulgen 染色による DNA の蛍光定量法も1968年 Ploem⁵⁾によって落射式照明装置での緑色光の照射による蛍光色素としての Pararosanilin Feulgen の発見以来, 測定器機の改良⁵⁻⁷⁾にともなうすぐれた DNA 定量法であることが明らかとなり, 本邦でも Fujita, S. et al.²⁹⁾, Fukuda, M.³⁰⁾は蛍光顕微測光法による核 DNA 定量とオートラジオグラフィを同一組織細胞について行い, DNA の合成や細胞増殖の解析を試みている。また最近では Flow cytometry の開発^{31, 32)}で瞬時に多数の細胞核 DNA 量の測定が行なわれるようになり, これと顕微分光測光法による核 DNA 量分布から G₀G₁ 期, S 期, G₂M 期の細胞分裂周期の推定が可能となった。同様に蛍光顕微測光法においても Feulgen 染色を厳密な条件下で行い, 精密な測光器機を用いて測定した場合, 細胞分裂サイクルに由来する核 DNA 量の変動を測定することが可能と思われ, 本法によって測定した1細胞集団の核

DNA 量は Fig. 13に示すような核 DNA 量ヒストグラムと細胞分裂サイクルとの相関として表わすことができる³³⁾。正常の組織細胞は増殖過程 G₊ サイクルに従って分裂増殖するが, 一定の増殖を遂げてからは生体, 組織の統制によって G₊ サイクルを離れ, 各細胞に応じた機能発現のため分裂休止状態 G₀ 期に移行する。しかし, 腫瘍化した細胞では, この増殖を休止させる機能 C に異常をきたし G₀ とは無関係に常に G₊ サイクルにあって増殖を続けるため, その核 DNA 量分布はヒストグラム上に Fig. 13のごとく反映されることとなる。即ち, 任意の Feulgen 核 DNA 蛍光量が一定で最も多数の細胞が占める15から25まではその細胞集団の 2c, 所謂 2 倍体領域の核 DNA 量を含む細胞が G₀G₁ 期に相当する細胞とみることができる。また, 40以上ならば 4c (4 倍体) 即ち, G₂M 期に相当する細胞, その中間値ならば S 期 (DNA 合成期) の細胞であるとはほぼ推定できると考えられる。さらに, 癌細胞の場合, 核内糸系異常分裂による染色体自体の増加にともなう生ずる aneuploidy や異常増殖の際みられる polyploidization 等も核 DNA 量ヒストグラム上に反映される。

Fig. 13 The correlation between nuclear DNA histogram and mitogenic cycle.

一方、ヒト唾液腺腫瘍の核 DNA 量の面からの検索は Eneroth & Zetterberg¹⁴⁻¹⁶⁾ 或いは Kino et al.^{17,18)} の研究 (顕微分光測光法) があるが、他の臓器組織の腫瘍における検索と比較して極めて少い。特に多形性腺腫についての核 DNA 量による総括的な診断学的研究はみられない。そこで著者は手術的に摘出された多形性腺腫30例の核 DNA 量を測定し、前述した基本的概念に従い整理された結果に基づいて臨床的悪性度或いは組織像と核 DNA 量との相関、核 DNA 量の面からみて悪性転化が示唆される症例 (多形性腺腫) の鑑別、各種組織パターンと核 DNA 量との関連等について、これまで報告されている他臓器組織に発生した腫瘍と比較して若干の考察を加える。

I. 良性多形性腺腫

i) 臨床的悪性度と核 DNA 量との相関について

25例の良性と診断された多形性腺腫における核 DNA 量は全例 2 倍体領域 (22例が 2 倍体, 1例が低 2 倍体, 2例が高 2 倍体) に mode がみられ, expansive な増殖を示す良性多形性腺腫の腫瘍細胞の stem line がいずれも 2 倍体にあるものと考えられる。また分裂周期別には G₀G₁ 期に相当する 2 倍体域細胞は最小 61.5% から最高 92.5%, 平均 80%, G₂M 期に相当する 4 倍体域の細胞は最小 0% から最高 19%, 平均 6.9%, この中間値の DNA 量を示す S 期の細胞は最小 5% から最高 27%, 平均 13.9% を示した。Kino et al.¹⁷⁾ の報告した局所再発のみられた 3 例を含む 6 例の良性混合腫瘍の検索でも全て 2 倍体に集束したヒストグラムパターンを示し、66% から 89% が 2 倍体域の細胞で占められている。この様に高 2 倍体域から 4 倍体域即ち、S 期から G₂M 期に入った腫瘍細胞の多少はある程度良性多形性腺腫における増殖力を反映していると思われるが、本研究では腫瘍の大きさとの相関はみられなかった。この点については病期との関係が今後の検索の課題と思われる。6 倍体域の腫瘍細胞は 25 例中 13 例 52% と Kino et al.¹⁷⁾ らの 6 症例中 4 例 67% に比較するとやや少いが、同様に Kino et al.¹⁷⁾ のワーチン腫瘍や Eneroth & Zetterberg¹⁶⁾ の monomorphic adenoma の検索で 6 倍体域の細胞の出現が全く認められなかったことから考えると、その鑑別は困難であるが、良性多形性腺腫内に染色体異常の存在或いは異常分裂の可能性がうかがえる。通常、多形性腺腫においてもその多くに扁平上皮化生をみるが、加藤ら¹¹⁾ の気管支上皮の扁平上皮化生の検索でも中等度の異型化生上皮に 4 倍体以上の核 DNA 量をもつ細胞の出現を高率に認め、非癌異型細胞において染色体異常の存在を示唆している。また高倍体の出現についても 25 例中 5 例にみられ、癌細胞の異常増殖の際と同様、良性多形性腺腫においても polyploidization が生じていることは確かである。case 7 を除く 4 症例は 8 倍体域の核 DNA 量を含む高倍体であり、その出現率は 0.5% から 2% までにとどまっている。しかし、各

Pleomorphic Adenoma

No. of Cases	G ₁ ~2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Polyploid 8 C ~
Case 2	92.5%	6.5%	1 %	0 %
Case 3	75	19	6	0
Case 4	88	5	7	0
Case 5	70.5	23.5	6	0
Case 6	64.5	27	8.5	0
Case 7	63.5	16	13	7.5
Case 8	85.5	10.5	4	0
Case 9	91	9	0	0
Case 10	81	12.5	6.5	0
Case 11	80	17	3	0
Case 12	68.5	21	10.5	0
Case 13	87	12.5	0.5	0
Case 14	77	14	8.5	0.5
Case 15	75.5	16.5	7	1
Case 16	74	14	12	0
Case 17	61.5	17.5	19	2
Case 18	85	8	7	0
Case 19	77	13.5	8.5	1
Case 20	80.5	12.5	7	0
Case 21	76	15.5	8.5	0
Case 22	67	23	10	0
Case 23	67	23.5	9.5	0
Case 28	91.5	7.5	1	0
Case 29	86.5	7	6.5	0
Case 30	83.5	15	1.5	0

Semimalignant pleomorphic adenoma

No. of Cases	G ₁ ~2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Poly- ploid 8 C ~
Case 1 P. M.	48 % 51	30 % 37.5	21 % 11.5	1 % 0
Case 24 Bi. S.M.	59.5 81.5	11 9	24.5 8.5	5 1
Case 25 Bi. S.M.	30.5 45.5	26 25.5	27 22	16.5 7
Case 27 Bi. S.M.	73 53.5	18.5 24.5	8.5 19	0 3

P. : Pleomorphic adenoma of parotid gland

M. : Pleomorphic adenoma of submandibular gland

Bi. : Biopsy, S.M. : Surgical material

Malignant pleomorphic adenoma

No. of Case Case 26	G ₁ ~2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4C	Poly- ploid 8 C ~
Bi. Gingiva	29.5%	32 %	36.5%	2 %
S.M. Gingiva	52 %	25	20	3
S.M. Nasal polyp	29.5	27.5	41	2
S.M. Maxi. sinus	44.5	20.5	27.5	7.5

Bi. : Biopsy, S.M. : Surgical material

Fig. 14 The percentage of tumor cells by cell division (cytokinesis) periods of all cases.

症例の対照として用いた正常唾液腺細胞には高倍体の出現が全く認められなかったことから、勿論原発臓器によって差はあるが、良性多形性腺腫においても組織学的に6倍体から8倍体に相当するやや大型で多染色核の細胞を混在することの多い充実性シート状増殖部やこの部から粘液腫様間質組織への移行部、さらには細胞密度の高い粘液腫様部の存在する症例で、特にその(6倍体域の腫瘍細胞)出現率が高い場合或いは8倍体以上の高倍体の出現がみられた場合には臨床的に良性像を示したとしても将来の癌化との関係についての検討が必要であろう。case 7については大型で異常形態を示す核を有する異型細胞が腺管構造をとる実質腫瘍組織内に散在性に認められ、これらの異型細胞に8倍体から16倍体に相当する核DNA

量を含有するものが多く、高倍体の出現は7.5%に達した。下口唇に発生した本症例は直径約1cmと小さく、被膜形成もほぼ完全で臨床的には定型的な良性像をとるものの異型細胞の出現と高倍体の出現は一致し、悪性化への高い potentiality を持つ症例と考えられた。しかし、後述する準悪性多形性腺腫や悪性多形性腺腫と核DNA量の面から比較した場合、本症例の腫瘍細胞のstem lineは明らかに2倍体に認められ、4倍体域即ち、G₂M期に相当する腫瘍細胞も13%と比較的少く、本症例が摘出時、準悪性多形性腺腫の一部や悪性多形性腺腫にみられるような浸潤性で組織破壊の強い増殖パターンを示していない理由と推測された。

ii) 組織パターンと核DNA量について

Solidly cellular areas

No. of Cases	G ₁ 2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Polyloid 8 C ~
Case 3	57.5%	32.5%	10 %	0 %
Case 7	60.5	9.5	17	13
Case 10	84.5	12.5	3	0
Case 14	76	16.5	7.5	0
Case 16	69	16	15	0
Case 17	69	14	15.5	1.5
Case 18	74.5	11	14.5	0
Case 19	80.5	10.5	7	2
Case 21	91	3	6	0
Case 22	44.5	37.5	17	0
Case 23	61.5	24.5	14	0
Case 24	81.5	9	8.5	1
Case 25	45.5	25.5	22	7
Case 26	79.5	16	4.5	0
Case 27	53.5	24.5	19	3
Case 28	87	11	2	0

Tubular areas

No. of Cases	G ₁ ~2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Polyloid 8 C ~
Case 2	86 %	11.5%	2.5%	0 %
Case 4	59.5	27	13.5	0
Case 6	59	32	9	0
Case 8	82.5	13	4.5	0
Case 11	67.5	28.5	4	0
Case 12	80.5	16.5	7	0
Case 16	96	4	0	0
Case 21	69.5	22	8.5	0
Case 22	63.5	29.5	7	0
Case 28	92	8	0	0
Case 30	75	23	2	0

Trabecular areas

No. of Cases	G ₁ ~2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Polyloid 8 C ~
Case 2	93 %	4 %	3 %	0 %
Case 14	78.5	15.5	5	1
Case 16	72.5	16.5	11	0

Myxoid areas

No. of Cases	G ₁ 2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Polyloid 8 C ~
Case 1	48 %	30 %	21 %	1 %
Case 3	77.5	18	4.5	0
Case 4	90	10	0	0
Case 10	80	11	9	0
Case 11	91.5	5.5	3	0
Case 12	52.5	30	17.5	0
Case 14	79.5	9	11.5	0
Case 17	59.5	19.5	19.5	1.5
Case 23	83.5	12	4.5	0
Case 26	18	23.5	42.5	16
Case 30	89	8	3	0

Myxo-chondroid areas

No. of Cases	G ₁ ~2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Polyloid 8 C ~
Case 8	88.5%	7.5%	4 %	0 %
Case 18	92.5	5	2.5	0
Case 19	70	18	12	0
Case 28	100	0	0	0

Chondroid areas

No. of Cases	G ₁ ~2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Polyloid 8 C ~
Case 3	97 %	3 %	0 %	0 %
Case 4	100	0	0	0
Case 12	79	12	9	0

Myoepithelioma areas

No. of Cases	G ₁ ~2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Polyloid 8 C ~
Case 2	100 %	0 %	0 %	0 %
Case 6	71	20.5	8.5	0
Case 18	88	7	5	0

Cylindromatous areas

No. of Cases	G ₁ ~2.5C	S 2.6C ~3.9C	G ₂ ~M 4 C	Polyloid 8 C ~
Case 9	91 %	9 %	0 %	0 %
Case 22	84.5	10.5	5	0
Case26-G	52	25	20	3
Case26-N	29.5	27.5	41	2

Fig. 15 The percentage of tumor cell by cell division (cytokinesis) periods in each histological pattern of all cases.

良性多形性腺腫にみられる組織パターンと核 DNA 量との相関をみると、いずれの部位でも腫瘍細胞の stem line は2倍体域にあると考えられるが、同一腫瘍組織内においても粘液軟骨様部を主体とした間葉系組織に比較して実質細胞から成る部位では4倍体以上の腫瘍細胞の出現が高率で、また高倍体の出現も実質細胞に出現する場合が圧倒的に多く、組織パターンによって、その増殖動態に差が認められることが示唆された。実質細胞から成る部位でも周囲間質に硝子化をとまなう索状配列部に比較して腺管構造の明瞭な部或いは充実性シート状部、特に充実性シート状配列を示す実質性増殖部ではS期から G₂M 期に入った腫瘍細胞の比率が高く、他の組織パターンよりも増殖力が強いものと推察された。間質組織ではいずれの組織パターン内でも G₀G₁ 期の細胞が80%以上を占めると考えられ、特に軟骨様部内や筋上皮腫様構造を示す部にはS期から G₂M 期に至る腫瘍細胞が少く(10%以下)、その増殖力は弱いものと推察された。かつて Foote & Frazell³⁴⁾や Eneroth et al.³⁵⁾によって指摘された組織構造と再発との関係で、実質細胞に富んだ症例で再発が多いと考えられたが、再発の可能性を含めて、その増殖動態を核 DNA 量の面から考察すると本研究結果はほぼ一致する見解と思われる。しかし、良性多形性腺腫における被膜形成と核 DNA 量の面からみた各症例の増殖動態、polyploidization 等との明らかな相関は認められなかった。

iii) 筋上皮型細胞と核 DNA 量について

多形性腺腫の発生起源が唾液腺導管部ないし終末部細胞であり、本腫瘍が腺上皮細胞由来であることは、現在多くの研究者によって支持されているところであるが、多形性腺腫に筋上皮細胞が関与していることも古くから指摘されている。Sheldon³⁶⁾や Azopardi & Smith³⁷⁾による P.T. A.H. 染色をはじめとした種々の方法での myofilament の同定、電顕的にも Oota et al.³⁸⁾によって初めて筋上皮細胞が確認されて以来 Mylius³⁹⁾, Welsh & Meyer⁴⁰⁾, Fukushima⁴¹⁾, 奥山⁴²⁾, 植野ら⁴³⁾がいずれも本腫瘍内に筋上皮型細胞を認めている。これらの研究では粘液腫様部内に腺上皮類似細胞と同時に myofilamentous bundle を含

む筋上皮型細胞の存在を観察している。また上皮細胞巣部では細胞巣周辺部にあって網状配列を示す星状細胞を筋上皮細胞とする報告が多い。本研究でも電顕的観察を行った case 11と case 17の粘液腫様部或いは上皮性腺管周囲から粘液腫様部への離開部には細胞内に organelle が少く、核膜に平行に走る多数の myofilamentous bundle を含む成熟型の筋上皮や細胞質内に錯走する短くて細い myofilament と随所に focal density を形成する所謂 neoplastic myoepithelium が認められた。また多形性腺腫においては case 7にみられたように腺管形成細胞周囲にみられる細胞間空隙の広い紡錘形細胞を筋上皮型腫瘍細胞と考えているものが多い⁴⁴⁾。この様に部位或いは細胞形態による筋上皮型細胞と腺上皮類似細胞を鑑別して測定した両細胞の核 DNA 量を比較 (case 6, 7, 17, 21) した場合、両細胞共にそのヒストグラムでは2倍体域に major mode がみられ、腺上皮類似細胞同様、筋上皮型腫瘍細胞もその stem line は2倍体にあると考えられる。しかし、4症例共に4倍体以上の腫瘍細胞の出現が多少の差こそあれ腺上皮類似細胞、筋上皮型細胞共に認められた。また高倍体の出現した case 7, 17両症例共に筋上皮型細胞と類似した形態を示す腫瘍細胞に8倍体以上の核 DNA 量を含むものが認められた。さらに、分裂周期別細胞比率でも、この筋上皮型細胞にS期から G₂M 期に相当するものが増加している。case 17と同様電顕的観察を行い筋上皮型細胞を確認した case 11の粘液腫様部でも4倍体域の DNA 量を含む細胞が認められた。この結果から考えると、多形性腺腫における粘液腫様の形成過程が、植野ら⁴³⁾の報告にあるように腺上皮性腫瘍細胞の異常型粘液分泌によって上皮細胞巣辺縁の筋上皮型細胞の配列に乱れが生じ、basal lamina の断列融解に伴って腺上皮性腫瘍細胞と共に間質側に混入する結果であることは事実としても、腺上皮類似細胞と同様、粘液腫様組織内に存在する筋上皮型細胞が分裂増殖能を有する可能性が高いと思われる。Hoshino & Yamamoto⁴⁵⁾, 佐藤ら⁴⁶⁾は気管支原発の adenoid cystic carcinoma の電顕的検索で筋上皮型細胞の特徴の一つとして、放射線抵抗性を挙げている。この Co⁶⁰ 照射後、分

泌型細胞はほとんど消失し、筋上皮型細胞のみ残存するが、再発増殖する場合には分泌型細胞をとまなうという事実は、核 DNA 量の面から筋上皮型細胞に増殖能を有する点からも唾液腺原発多形性腺腫の手術時取り残され、筋上皮型細胞を含む粘液腫様組織から成る satellite nodule からの再発或いは悪性の可能性もうかがわれる。

II. 準悪性多形性腺腫

i) 臨床的悪性度と核 DNA 量との相関について

核 DNA 量の面から準悪性多形性腺腫 4 症例をみると、3 例のヒストグラムパターンは 2 倍体域に major mode を持つ良性多形性腺腫と類似した単峰性パターンを示し、基本的にその腫瘍細胞の stem line は 2 倍体にあるものと考えられる。しかし、4 倍体以上の腫瘍細胞はいずれの症例でも高率に認められ、本研究では 4 倍体以上の腫瘍細胞が 20% を越す比率で認められることが良性多形性腺腫との相違と考えられた。分裂周期別細胞比率でみても S 期から G₂M 期に入った腫瘍細胞は 4 例の平均で 40.6% と良性多形性腺腫 25 例の平均 21.6% と比較して約 2 倍の高値を示し、臨床的に定型的な良性像を呈する症例と比較して増殖力の強いことが示唆された。高倍体の出現も 4 症例共に認められ、核 DNA 量の面から悪性化への過程にある一つの徴候と思われる。特に、16 倍体域の核 DNA 量を含む高倍体の出現がみられた case 24 はヒストグラムパターンからみても、その mode は 2 倍体にあるが、4 倍体域に比較的高い 2 次ピークがみられ、良性多形性腺腫に比べて腫瘍細胞の倍加時間の短縮を反映している。同様に、case 25 でも S 期に相当する腫瘍細胞が著明に増加し、生検材料においてそのピークは 3 倍体域に認められ、aneuploidy の徴候を示唆している。Kino et al.¹⁷⁾ の報告でも唾液腺良性腫瘍や高分化型粘表皮腫の核 DNA 量は 2 倍体または 4 倍体であり、また現在まで異数倍体性を示すヒト良性腫瘍の報告がないことや或いは明らかな浸潤性発育に伴う潰瘍形成という臨床像を考慮しても悪性と判断すべき症例と考えられた。

ii) 組織型、異型性と核 DNA 量との相関について

前述した様に、本研究において準悪性多形性腺腫と診断され、核 DNA 量の面からも悪性または悪性化への過程にあることが特に強く示唆された症例は組織学的に円柱状或いは多角形の明らかに腺上皮に類似した上皮性腫瘍細胞が主体を成し、その組織型は小葉状構造の顕著な充実性を示すものや比較的高度の異型性を示す実質性腫瘍細胞から成る腺管の浸潤性発育を示す場合が多い。充実型の場合も腺腫型の場合も異型性が高度になるに従って高倍体の出現が増し、多形性腺腫において異型性の出現と異常分裂との相関が示唆された。また、腫瘍細胞の核形態も大型で核辺縁の不整がみられる場合、高倍体であり、このような異型細胞を認める症例で polyploidization が生じていることはほぼ確実と考えられた。一方、case 1 に認められた粘液腫様部内に一部軟骨形成を伴う satellite nodule の周囲組織内への増殖が著しい症例では高倍体の出現にともなう悪性化への潜在性はどう否定できないものの充実型や腺腫型に比べて核 DNA 量の面からみた腫瘍細胞自体の増殖力は比較的に弱いものと考えられた。

III. 悪性多形性腺腫

i) 臨床的悪性度と核 DNA 量との相関について

今回検索した悪性多形性腺腫のヒストグラムパターンは生検材料では 3 倍体に低いピークを示し、また摘出材料の total histogram では一応 2 倍体に不明瞭な小ピークを有するものの 16 倍体域の高倍体を含む幅広い核 DNA 量分布がみられ、mode の消失傾向を認めた。このことは Kino et al.¹⁷⁾ の悪性化した未分化な mucoepidermoid carcinoma が明瞭なピークのない異数倍体性の DNA 量分布を示す報告や Eneroth & Zettenberg^{14,15)} の報告にある核 DNA 量の増加を認めた adenocarcinoma, mucoepidermoid carcinoma の DNA 量分布と極めて類似し、悪性多形性腺腫或いは多形性腺腫の悪性化に際して polyploidization はもちろん異数倍体性を示す症例が存在することを実証するものであろう。4 倍体域の腫瘍細胞の出現も生検材料で 36.5%、摘出材料の平均で 29.5% と高値を示し、井上ら³²⁾ の肺腺癌細胞（培養細胞）の 38.5% や神経芽細胞腫細胞（培養細胞）の 40.0

%に近い。分裂周期別細胞比率でもS期からG₂M期に至る腫瘍細胞は生検材料68.5%, 摘出材料の平均53.8%と腫瘍細胞集団内に占めるG₁期に相当する細胞に比べて著しく高い値を示した。このDNA合成期から分裂期に入った細胞の腫瘍細胞集団内に占める比率は良性多形性腺腫の平均21.6%, 準悪性多形性腺腫の平均40.6%と比較して明らかに臨床的悪性度と相関し, 核DNA量の面からみた多形性腺腫の増殖動態に臨床的悪性度との段階的相関が認められることが推測された。

ii) 組織パターンと核DNA量について

著者が今回検索対照とした悪性多形性腺腫の組織像は, その診断根拠となったToluidine blue (pH 4.1) 染色で著明なmetachromasiaを示す酸性ムコ多糖を含む粘液腫様間質組織の形成と, 同時にmonomorphicな充実性腫瘍細胞巢の残存, さらに浸潤部の組織パターンの多くを占めたcribriform patternの形成等著しい多形性を認めるものであった。多形性腺腫におけるcribriform patternの形成に関しては1935年Ahlbom⁴⁷⁾によってsemimalignant typeとして報告されて以来多くの報告⁴⁸⁻⁵¹⁾があるが, 現在ではadenoid cystic carcinomaの定義が明確にされ, semimalignant typeとしての考え方は否定されるようになった。しかし, 現在でもadenoid cystic carcinomaとcribriform patternを含む多形性腺腫との診断が困難な場合があるとの報告もみられ, 本邦でも佐久間⁵¹⁾は多形性腺腫のcribriform typeからadenoid cystic carcinomaへの移行の可能性を推察している。著者の検索した悪性多形性腺腫の核DNA量分布を組織パターン別にみるとcribriform patternを形成する腫瘍細胞の核DNA量分布は, 高倍体の出現が比較的少ないものの, 2倍体域から3倍体へのmodeのshiftがみられ, 多くの腫瘍の核DNA量の検索と同様に悪性腫瘍のヒストグラムパターンの特徴を示していると考えられた。しかし, 2例の良性多形性腺腫内にみられたcribriform patternの核DNA量分布は2倍体にmodeをみる明らかな良性のヒストグラムパターンを示し, 組織パターンが同一であっても一概に悪性化を示唆するものではなく, 異型性との関連を考慮に入れる必要があることを

示している。また, 異常核分裂像を含む腫瘍細胞に高度の異型性を示した粘液腫瘍部ではmodeの消失傾向と共に16倍体域を含む高率な高倍体の出現がみられ, 他臓器に発生する低分化型腺癌に極めて類似し, 悪性腫瘍細胞集団の定型的なヒストグラムパターンに近いと考えられた。さらに, 悪性多形性腺腫には症例によって最初から悪性のものと, 良性型の2次的な悪性化によるものとが考えられている。太田⁴⁹⁾, 島田⁵²⁾は良性型の悪性化した部分の組織像について, 一般型腺癌, 腺様嚢胞癌或いは扁平上皮癌の形をとることを指摘している。この様な見方からすれば本症例も組織学的に良性型の悪性化と考えられるが, DNA量の面からも2倍体にmodeをもつ良性多形性腺腫に類似した充実性増殖部が腫瘍組織内に残存することは本症例が最初から悪性として増殖したのではなく, 良性として存在した多形性腺腫がある時期に悪性化したものであることを推測することができる。

IV. 多形性腺腫の核DNA量による良性・悪性の判定基準について

田中⁵³⁾は悪性腫瘍の核DNA量分布についての総括で, 悪性腫瘍細胞であっても高分化型腺癌, 高分化型移行上皮癌或いは細胞の大小不同が乏しい高分化型悪性リンパ腫などでは悪性の特徴は出現しない場合が多く, また扁平上皮癌かdysplasiaかの区別はある程度可能であるがsever dysplasiaと高分化型扁平上皮癌或いは前期の高分化型癌と境界領域病変との鑑別は困難であることを述べている。高橋⁵⁴⁾や小中²⁰⁾の乳腺腫瘍の検索でもmodeによる分類で良性悪性を鑑別することは困難であり, またmodeの位置だけで悪性度との関係を論ずることは妥当でないと結論している。しかし, 最近藤田⁵⁵⁾は110例の胃癌組織から単離した細胞について詳細なDNA定量(DNA蛍光顕微測光法)を行って, 癌細胞では99%以上の症例に4倍体以上の核DNA量をもつ多倍体を伴い, その内絶対多数が異倍体であることを証明し, 胃癌の場合異倍体性であれば癌であることを確実視している。多形性腺腫の場合も核DNA量の面から悪性或いは悪性化が十分に示唆される症例では次の様な特徴が挙げられる。

1) 3 倍体以上に mode を有し、本法で S 期から G₂M 期に相当する細胞が 40% を越える症例。

2) mode が 2 倍体にあっても 4 倍体以上の多倍体が本法で 20% を越す症例。

3) mode が 2 倍体域にあっても 10 倍体以上の高倍体を認める場合、特に高倍体が 5 % 以上認められる症例。

4) stem line の消失傾向或いは mode の高 2 倍体域への偏位がみられ、少数でも高倍体の出現がみられる症例。

この様な DNA 量分布を示す症例では、たとえ臨床的に良性像或いは組織学的に良性型を呈していたとしても悪性化への potentiality を有する症例として、術後を含めて十分な経過観察が必要であると考えられる。

現在まで、主として顕微分光測光法による各種腫瘍細胞についての核 DNA 量の検索においてはパラフィン切片標本、塗抹ないし剝離細胞が用いられ、最近ではパラフィン切片標本からの分離細胞核が用いられるようになった。組織切片上での測定は核の切断や隣接細胞の重積等の問題が含まれ、正確に細胞 1 個の核 DNA 量を表わしていないとの批判や矢谷²¹⁾らの組織切片標本上での甲状腺癌の核 DNA 量の測定において、2 倍体付近に明瞭なピークを示す症例から多峰性で高倍体まで幅広く分布する症例まで塗抹標本での測定と同様の結果を示している報告まで賛否様々である。顕微分光測光法にしる蛍光顕微測光法にしる組織切片での測定の場合、切断された核を測定していることが多いことは事実であり、正確に細胞 1 個の核 DNA 量を示していないことは理論的に十分考えうることである。しかし、落射蛍光測光装置による蛍光顕微測光法の場合、透過光の吸収率を測定する分光測光と異なり、平均に切断された核を測定するとしても隣接細胞の核を含む可能性は極めて少い。さらに、OMA を組み合わせることによって測定誤差を少なくすることで本法が診断学的に十分に悪性度との関係を推定する一助と成り得ると考えられる。また、唾液腺腫瘍のようにその組織像が多採であり、組織パターンによる腫瘍細胞集団の増殖動態について検索することを目的とした場合の手段としては極めて有意義であること

が確められた。

結 論

唾液腺に原発した多形性腺腫 30 例（準悪性多形性腺腫 4 例、悪性多形性腺腫 1 例を含む）の腫瘍細胞核 DNA 量（Feulgen 核 DNA 蛍光顕微測光法、10 μ の組織切片）を測定し、本腫瘍の組織パターンや細胞異型或いは臨床的悪性度と核 DNA 量との相関について検索し、次の結論を得た。

核 DNA の測定には、各組織パターン別にその増殖動態を検索（組織切片レベル）するため、従来のフォトマルを OMA に変換したオリンパス MMSP-RF-KS 落射型蛍光顕微測光装置を用いた。

1) 良性多形性腺腫 25 例の核 DNA 量分布は全例 2 倍体域に mode がみられ、腫瘍細胞の stem line はいずれも 2 倍体にあるものと考えられた。また、25 例中 2 例は 8 倍体から 16 倍体の高倍体を含む 4 倍体（G₂M 期に相当する）以上の細胞が増加し、核 DNA 量の面から悪性化の可能性が高い症例であることが鑑別できた。

2) 良性多形性腺腫において、6 倍体域の腫瘍細胞の出現が 25 例中 13 例（52%）、高倍体の出現が 25 例中 5 例（20%）に認められ、染色体異常或いは異常分裂の存在が示唆された。

3) 良性多形性腺腫の組織パターン別核 DNA 量分布から筋上皮の関与が示唆された軟骨様組織、筋上皮腫様部、粘液腫様部に比較して充実性増殖を主体とした実質性細胞巣部において、その増殖力が高いことが認められた。

4) 電顕的観察を行った一部の症例（良性多形性腺腫）で筋上皮型腫瘍細胞を確認し、この筋上皮型細胞に増殖能が存在することが明らかとなった。

5) 準悪性多形性腺腫の核 DNA 量分布では、4 例ともに基本的に腫瘍細胞の stem line は、2 倍体に認められたが、全例に高倍体の出現がみられ、4 倍体（G₂M 期）以上の腫瘍細胞は各症例 15 % を越す比率で出現し、これに S 期の細胞を含めると平均 40.6% と高値を示した。

6) 準悪性多形性腺腫のうち、組織学的にも悪性化が強く示唆された症例では mode の 3 倍体域

への shift 或いは 4 倍体域に 2 次ピークが出現し、その核 DNA 量ヒストグラム上に腫瘍細胞の倍加時間の短縮が反映され増殖能の高いことが推測された。

7) 悪性多形性腺腫の核 DNA 量分布では、mode の消失傾向或いは 3 倍体域への明らかな shift (異倍体性)、16 倍体域を含む高倍体の高率な出現等ヒストグラム上に悪性腫瘍として特徴あるパターンを示した。また、4 倍体以上の腫瘍細胞或いは S 期から G₂M 期の腫瘍細胞の著しい増加 (4 倍体で約 30%、これに S 期を含めると 50% 以上) を認めた。さらに悪性多形性腺腫においても組織パターンによってその増殖力の異なることが確められた。

以上、多形性腺腫においては、本法による検索

で polyploid (高倍体) の高率な出現 (5% 以上) や mode の 3 倍体域への shift, stem line の消失が認められた場合或いは G₀G₁ 期細胞の減少にともなう S 期から G₂M 期に至る細胞の増加 (特に 50% 越す場合) した場合には、悪性或いは悪性化する potentiality を有する症例である可能性が強く示唆されることが明らかとなった。

謝辞：稿を終えるに当たり、終始御指導と御校閲を賜りました神奈川歯科大学病理学教室久田太郎教授に心より感謝を捧げます。

本論文の要旨は 1981 年 11 月 28 日第 26 回日本唾液腺シンポジウムにおいて発表した。

本研究は昭和 56 年 (1981 年) 文部省科学研究費 (奨励研究) によるものである。

抄録：唾液腺に原発した多形性腺腫 30 例 (準悪性多形性腺腫 4 例、悪性多形性腺腫 1 例を含む) の腫瘍細胞核 DNA 量 (Feulgen 核 DNA 顕微螢光測光法, 10 μ の組織切片) を測定し、本腫瘍の組織型や細胞異型或いは臨床的悪性度と核 DNA 量との相関について検索した。臨床的に良性所見を示した 25 例の多形性腺腫では、そのほとんどが diploid に集束したヒストグラムを示し、各症例の細胞分裂周期別の細胞比率でも G₁ 期に相当する腫瘍細胞が多数 (61.5~92.5%) を占め、本腫瘍の増殖が通常緩慢であることが核 DNA 量に反映された。これに対し、準悪性或いは悪性多形性腺腫では、polyploid の比較的高率 (5% 以上) な出現や major mode の 3c 領域への shift, stem line の消失さらには、S 期から G₂M 期 (40.5~69.5%) に相当する腫瘍細胞の著しい増加を特徴とし、核 DNA 量にこれらの変化が出現した場合には、悪性化する potentiality を有する症例である可能性が強く示唆されることが明らかとなった。

文 献

- 1) Atkin, N. B., Mattinson, G. and Baker, M. C.: A comparison of the DNA content and chromosome number of fifty human tumours. *Br. J. cancer.*, **20** : 87-101, 1966.
- 2) Atkin, N. B.: Perimodal variation of DNA values of normal and malignant cells. *Acta Cytol.*, **14** : 270-273, 1969.
- 3) Richards, B. M. and Atkin, N. B.: The differences between normal and cancerous tissues with respect to the ratio of DNA content to chromosome number. *Acta Un. Int. Canc.*, **16** : 124-128, 1960.
- 4) Hauechka, T. S.: Chromosome patterns in primary neoplasia. *Exp. Cell Res. Suppl.*, **9** : 86-98, 1963.
- 5) Pleom, J. S.: The use of a vertical illuminator with Interchangeable Dichroic Mirror for Fluorescence Microscope with Incident Light. *Z. Wiss. Mikroskopie.*, **68** (3) : 129-142, 1967.
- 6) Walter, F.: Fluoreszenzmikroskopie in Biologie und Medizin.: Leitz-Mitt. Wiss. U. Techn. V., **33-40**, 1972.
- 7) 植竹敏文, 米窪 健: 新しい落射螢光顕微鏡, 生体の科学, **25** : 70-81, 1974.
- 8) Adams, L. R. and Dahlgren, S. E.: Cytophotometric measurements of the DNA content of lung tumours. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **72** : 561-574, 1968.
- 9) Greisen, O.: Deoxyribonucleic acid content in bronchogenic carcinoma with special reference polypoid cell nuclei. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **77** : 177-186, 1969.
- 10) Reid, B. L. and Singh, S.: Deoxyribonucleic acid values (Feulgen microspectrophotometry) in epithelium of human ectocervix, normal and cancerous. *J. Nat. Cancer Inst.*, **25** : 1291-1301, 1960.
- 11) 加藤治文, 早田義博: 肺扁平上皮癌の発癌過程と DNA 分析—気管支上皮扁平上皮化生, *car-*

- cinoma in situ 及び角化扁平上皮癌の細胞について, 肺癌, 17 : 267-279, 1977.
- 12) Lamb, D.: Correlation of chromosome counts with histological appearances and prognosis in transitional-cell carcinoma of bladder. *Brit. Med. J.*, 1 : 273-277, 1967.
 - 13) Zetterberg, A. and Esposti, P. L.: Cytophotometric DNA analysis of aspirated cell from prostatic carcinoma. *Acta cytol.*, 20 : 46-57, 1976.
 - 14) Eneroth, C. M. and Zetterberg, A.: The relationship between the nuclear DNA content in smears of aspirates and the prognosis of mucoepidermoid carcinoma. *Acta Otolaryngol.*, 80 : 429-433, 1975.
 - 15) Eneroth, C. M. and Zetterberg, A.: Microspectrophotometric DNA analysis of malignant salivary gland tumours. *Acta Otolaryngol.*, 77 : 289-294, 1974.
 - 16) Eneroth, C. M. and Zetterberg, A.: Nuclear DNA content as a criterion of malignancy in salivary gland tumors of the oral cavity. *Acta Otolaryngologica.*, 75 : 296-298, 1973.
 - 17) Kino, I., Rechart, R. M. and Lattes, R.: Nuclear DNA in salivary gland tumors. I. Warthin tumors, benign mixed tumors and mucoepidermoid carcinomas. *Archives of Pathology.*, 95 : 245-255, 1973.
 - 18) Kino, I., Richart, R. M. and Lattes, R.: Nuclear DNA in Salivary Gland Tumors. II. Adenocystic carcinomas. *Archives of Pathology.*, 95 : 325-329, 1973.
 - 19) Toews, H. A., Katayama, K. P., Masukawa, T. and Lewison, E. F.: Chromosomes of benign and malignant lesions of the breast. *Cancer.*, 22 : 1296-1307, 1968.
 - 20) 小中千守: 乳腺腫瘍細胞の核 DNA 定量による診断学的研究. 日臨細胞誌, 18 : 127-139, 1979.
 - 21) 矢谷隆一, 草野五男, 村林喜郎, 太田昌親, 伊藤忠弘, 斉藤みち子, 柴田偉雄: 甲状腺結節性病変における核 DNA 量解析の診断的意義, 日臨細胞誌, 20 : 1-7, 1981.
 - 22) 花輪 聡: 大腸癌の細胞核 DNA 量に関する研究 (特に病理形態像との関連について). 大腸肛門誌, 31 : 450-467, 1987.
 - 23) 北島晴比古: 舌病変における細胞核 DNA 量の研究, 舌癌を中心として. 日口外誌, 26 : 583-600, 1980.
 - 24) 朔 敬: 舌扁平上皮癌の予後因子の検討—組織像ならびに核 DNA 量を中心として—, 日口外誌, 26 : 279-294, 1980.
 - 25) Leuchtenberger, C., Leuchtenberger, R. and Davis, A. M.: A microspectrophotometric study of the desoxyribose nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissue. *Am. J. Path.*, 30 : 65-85, 1954.
 - 26) Askin, N. B. and Richards, B. M.: Deoxyribonucleic acid in human tumours as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain; A comparison of tumours arising at different sites. *Br. J. Cancer.*, 10 : 769-786, 1956.
 - 27) Böhm, N. and Sandritter, W.: DNA in human tumors; A cytophotometric study. *Curr. Topics Pat.*, 60 : 151-219, 1975.
 - 28) Sandritter, W., Carl, M. and Ritter, W. R.: Cytophotometric measurements of the DNA content of human malignant tumors by means of the Feulgen reaction. *Acta cytol.*, 10 : 26-30, 1966.
 - 29) Fujita, S., Ashihara, T. and Fukuda, M.: Simultaneous measurement of DNA content and grain count on an autoradiographs of Feulgen stained cells. *Histochemistry.*, 40 : 155-163, 1974.
 - 30) Fukuda, M.: Microspectrophotometric measurement of DNA on isolated epidermal cells, combined with H-TdR autoradiography. *Acta Histochem. Cytochem.*, 5 : 132-145, 1972.
 - 31) 太田和雄, 高木 滋, 御供泰治: DNA 瞬間自動測定装置. 癌と化学療法, 4 : 179-185, 1977.
 - 32) 井上勝一, 宮本 宏, 阿部庄作, 村尾 誠, 遠藤隆志, 荒川三紀雄, 水野重孝, 桑島俊彦, 赤間正義, 田村浩一: ヒト癌細胞の核 DNA の測定—顕微分光測光法と Flow cytometry の比較を中心として—. 日臨細胞誌, 21 : 1-7, 1982.
 - 33) 藤田哲也, 福田 優: 新組織化学〔核酸, DNA (小川和朗, 武内忠男, 森富, 編集)〕初版 481, 朝倉書店, 1975.
 - 34) Foote, F. W. and Frazell, E. L.: Tumors of the major salivary glands. *Cancer*, 6 : 1065, 1963.
 - 35) Eneroth, C.-M.: Zur Frage der Semimalignität bei Mischtumoren der grossen Speicheldrüsen. *Arch. Ohr. Nas. Kehlk.*, 184 : 430, 1965.
 - 36) Scheldon, W. H.: So-called mixed tumor of the salivary glands. *Arch. Path.*, 35 : 1-20, 1943.
 - 37) Azzopardi, J. G. and Smith, O. D.: Salivary gland tumors and their mucins. *J. Path. Bact.*, 77 : 131-140, 1959.
 - 38) Oota, K. and Takahashi, H.: Electronmicroscopic studies on the so-called benign mixed tumor of the salivary gland. *Gunn.*, 49 (Suppl.): 234-235, 1958.
 - 39) Mylius, E. A.: The identification and the

- role of the myoepithelial cell in salivary gland tumors. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **50** (Suppl.) **139** : 1-81, 1960.
- 40) Welsh, R. A. and Meyer, A. T.: Mixed tumors of human salivary gland. *Arch. Path.*, **85** : 433-447, 1968.
- 41) Fukushima, M.: An electron microscopic study of human salivary gland tumors, pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, **15** : 387-408, 1968.
- 42) 奥山 雅 : 口蓋腺より発生した多形性腺腫および粘表皮癌の超微細構造について. *歯科学報* **70** : 593-645, 1970.
- 43) 植野 茂, 覚道健治, 森本忠三, 野口勝弘, 高須 淳 : 多形性腺腫の電顕的観察—粘液腫様部の組織由来—. *日口外誌*, **24** : 64-75, 1978.
- 44) Thackray, A. C. and Lucas, R. B.: *TUMORS of the MAJOR SALIVARY GLANDS* Pleomorphic adenoma (mixed tumor) AFIP, 16-38, Washington, D. C., 1974.
- 45) Hoshino, M. and Yamamoto, T.: Ultrastructure of adenoidcystic carcinoma. *Cancer.*, **25** : 186-198, 1970.
- 46) 佐藤秩子, 星野宗光 : 気管支腺腫瘍における筋上皮性細胞の増殖像. *癌の臨床*, **19** : 183-187, 1973.
- 47) Ahlbom, H. E.: Mucous and salivary-gland tumors., *Acta radiol. Suppl.*, **23** : 1935.
- 48) Eneroth, C. M.: Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular gland and palate region. *Cancer.*, **27** : 1415-1418, 1971.
- 49) 太田邦夫 : 唾液腺腫瘍について (形態学的問題を中心に). *臨床病理*, **3** : 203-213, 1955.
- 50) 馬場謙介, 鷺津邦雄, 海老原敏, 小野 勇, 下里幸雄, 竹田千里 : 唾液腺腫瘍—その組織型と予後—. *癌の臨床*, **19** : 893-911, 1955.
- 51) 佐久間真弓, 古和田 勲, 草刈 潤, 若狭治毅 : 唾液腺腫瘍の集計と病理組織学的考察. *耳鼻と臨床*, **25** : 258-264, 1878.
- 52) 島田義弘 : 所謂唾液腺混合腫瘍の組織発生について. *日病会誌*, **44** : 243, 1955.
- 53) 田中 昇 : 細胞診に必要な基本的細胞学. *臨床病理 (臨時増刊) 特集* **41** : 13-20, 1980.
- 54) 高橋秀禎: 乳腺腫瘍の塗抹細胞における核 DNA 核量の検討. *日臨細胞誌*, **19** : 52-63, 1880.
- 55) 藤田哲也 : 細胞動態からみた胃癌の発生と進展 *日病会誌*, **70** : 23-54, 1981.

Explanation of Photographs

- Photo 2 Photomicrograph showing the solid area of benign pleomorphic adenoma (case 10). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 3 Photomicrograph showing the tubular area of benign pleomorphic adenoma (case 14). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 4 Photomicrograph showing the trabecular area of benign pleomorphic adenoma (case 2). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 5 Photomicrograph showing the myxoid area of benign pleomorphic adenoma (case 11). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 6 Photomicrograph showing the chondromatous area of benign pleomorphic adenoma (case 12). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 7 Photomicrograph showing the myoepithelioma pattern of benign pleomorphic adenoma (case 6). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 8 Photomicrograph showing the epithelial duct and duct lining dark cells (neoplastic myoepithelium) of pleomorphic adenoma (case 7). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 9 Photomicrograph showing the epithelial ductlike structure and spindle-shaped tumor cells in loose mucoid matrix of pleomorphic adenoma (case 17). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 10 Photomicrograph showing the duct-columnar-derived epithelial tumor cells consist of solid pattern (semimalignant pleomorphic adenoma, case 24). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 11 Photomicrograph showing the infiltrating atypical gland of semimalignant pleomorphic adenoma (case 25). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 12 Photomicrograph showing the cribriform pattern of malignant pleomorphic adenoma (case 26). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 13 Photomicrograph showing the markedly atypical tumor cells in myxoid area of malignant pleomorphic adenoma (case 26). H.E. stain, $\times 400$.
- Photo 14 Electron micrograph showing mucous cell-like and serous cell-like neoplastic epithelial cells which lining the lumen. The tumor cells is filled with electron-lucent mucous granules and dense secretory granules, respectively. Numerous short microvilli extend from the apical surface into the lumen. MG: mucous granule, SG: serous granule, Lu: lumen M: mitochondria, Mv: microvilli. (case 17). $\times 17000$.
- Photo 15 Electron micrograph showing squamous metaplastic cells. Tb: tonofibril, M: mitochondria. (case 17). $\times 14000$.
- Photo 16 Electron micrograph showing myoepithelial cell which lie in the myxomatous area of pleomorphic adenoma. Mf: myofilament. (case 11). $\times 30000$.
- Photo 17 Electron micrograph showing neoplastic myoepithelial cell. The cytoplasm is occupied by numerous filaments. Arrow: focal density. Mf: myofilament. (case 17). $\times 14000$.
- Photo 18 Nuclear Feulgen DNA fluorescence of tumor cells consist of tubular pattern (benign pleomorphic adenoma, case 22). $\times 400$.
- Photo 19 Nuclear Feulgen DNA fluorescence of tumor cells consist of trabecular pattern (benign pleomorphic adenoma, case 16). $\times 400$.
- Photo 20 Nuclear Feulgen DNA fluorescence of tumor cells consist of myxoid area (benign pleomorphic adenoma, case 10). $\times 400$.
- Photo 21 Nuclear Feulgen DNA fluorescence of tumor cells consist of myoepithelioma pattern (benign pleomorphic adenoma, case 6). $\times 400$.
- Photo 22 Nuclear Feulgen DNA fluorescence of tumor cells between solid area and myxoid area. Arrow: Polyploid, 8c (benign pleomorphic adenoma, case 1). $\times 400$.
- Photo 23 Nuclear Feulgen DNA fluorescence of duct-columnar-derived epithelial tumor cells consist of solid pattern. Arrow: Polyploid, 16c (semimalignant pleomorphic adenoma, case 24). $\times 400$.
- Photo 24 Nuclear Feulgen DNA fluorescence of infiltrating atypical gland of semimalignant pleomorphic adenoma (case 25). Arrow: Polyploid, 8c and 16c, $\times 400$.
- Photo 25 Nuclear Feulgen DNA fluorescence of markedly atypical tumor cells in myxoid area of malignant pleomorphic adenoma (case 26). $\times 400$.