口腔扁平上皮癌の増殖活性に関する免疫組織化学的研究

赤 間 功

九州歯科大学口腔外科学第2講座 (指導: 梶山 稔教授)

平成7年8月25日受理

Immunohistochemical Study on Proliferative Activity of Cancer Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma

Isao Akama

Second Department of Oral Surgery (Director: Prof. Minoru Kajiyama)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

The proliferative activity of cancer cells in oral squamous cell carcinoma has been identified as an important predictor of biologic behavior and as a potential guide for cancer therapy. The proliferative capacity was analyzed immunohistochemically using monoclonal antibody against PCNA and p53 protein in biopsy or surgical resected specimens from 51 cases with oral squamous cell carcinoma (SCC). The results were as follows:

1) There was a significant difference in PCNA score between p53 protein-positive cases and p53 protein-negative cases; $37.9 \pm 11.9\%$ ($n=28$), $30.8 \pm 11.1\%$ ($n=23$) ($p<0.01$).

2) The immunostaining of p53 protein and PCNA was localized in similar areas of oral cancer tissue.

3) In oral SCC, there was no significant correlation between PCNA score of p53 protein-positive cases and the prognosis, the TNM status.

4) There was no significant correlation between PCNA-positive rate of p53 protein-positive cases and histological differentiation. However, PCNA score of p53 protein-positive cases correlated with 4C type and 4D type in the mode of invasion.

5) PCNA-positive rate of p53 protein-positive cases correlated with the grade of malignancy.

These results suggest that the PCNA-positive rate of p53 protein-positive cases provides important information of invasion, proliferative activity and in predicting the early recurrence and prognosis of patients with surgically resected oral SCC.

Key words : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) / P53 protein / Proliferative activity
/ Oral squamous cell carcinoma / Immunohistochemistry

緒 言

多彩な生物学的性状を有する悪性腫瘍を、よりの確に把握することは重要なことである。とくに、腫瘍細胞における浸潤、増殖の速さやその特性などの、いわゆる増殖活性を熟知することは、合理的な治療方針の決定や、病態および予後の推定に重要な意義をもっている¹⁻⁴⁾。

これまでに、細胞動態の研究にはオートラジオグラフィが利用されてきたが、近年、新鮮凍結切片を用いて Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みにより S 期細胞を検出する方法 (BrdU 法)^{5,6)}、増殖細胞の核内に存在する Ki-67 反応性抗原を利用する方法 (Ki-67 法)⁵⁾、増殖サイクルにあるすべての細胞に発現し、増殖活性を利用する方法 (DNA polymerase α 法)⁷⁾ などが応用されている。一方、細胞周期の G1 後期から S 期に出現する増殖細胞に特異的な核内蛋白で、DNA の複製に重要な役割を果たす増殖細胞の核内抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, 以下 PCNA と略す) のモノクローナル抗体が開発され^{8,9)}、腫瘍の増殖能を客観的に評価しうることから、臨床での応用が期待されている^{3,4)}。

一方、細胞の癌化は、その分化や増殖を制御する遺伝子の変化によって規定されることが明らかとなり、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異が蓄積されることによって癌が発生すると考えられている⁹⁻¹¹⁾。とくに、p53 遺伝子は大腸癌、肺癌、乳癌をはじめとする多くの悪性腫瘍において、その変異が高率にみられ、その過剰発現が認められている¹¹⁾。また、変異型の p53 蛋白は細胞周期を調節し、腫瘍増殖にも密接に関与するとされている¹²⁾。

そこで、筆者は口腔扁平上皮癌を対象として、腫瘍の増殖細胞マーカーである PCNA および癌抑制遺伝子である p53 蛋白の異常発現を免疫組織化学的に検索するとともに、腫瘍増殖能との関連性について検討したので、その成績を報告する。

対象症例ならびに研究方法

A. 対象症例

1988 年から 1994 年までの過去 7 年間に当科を受診し、病理組織学的に口腔扁平上皮癌と確定診断され、加療を行った 51 症例 (一次症例) を対象とした。

発現部位は、上顎歯肉 22 例 (43.1%)、舌 14 例 (27.5%)、下顎歯肉 12 例 (23.5%)、頬粘膜 2 例 (3.9%)、口底 1 例 (2.0%) であった (Fig. 1)。また、発現年齢は 37 歳から 89 歳までの広範囲におよび、

30 代 4 例 (7.8%)、40 代 7 例 (13.7%)、50 代 7 例 (13.7%)、60 代 21 例 (41.2%)、70 代 9 例 (17.6%)、80 代 3 例 (5.9%) で、60 代をピークに 70 代の高齢者に多くみられ、その平均年齢は 60.7 歳であった。なお、性別は男性 32 例 (62.7%)、女性 19 例 (37.3%) で、それぞれの平均年齢は男性 60.9 歳、女性 60.7 歳であった (Table 1)。

B. 研究方法

1. 病理組織学的な検索方法

口腔扁平上皮癌の周辺部粘膜を含めた生検組織片、および病巣を中心とした周囲組織を含めて外科的に切除された粘膜組織片を研究材料とした。いずれの組織片も採取後、ただちに 10% の中性緩衝ホルマリン水溶液に固定し、通法のごとくパラフィン包埋を行い、5 μ m の薄切連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン重染色 (以下 H・E 染色と略す) を施し、病理組織学的に観察を行った。

口腔扁平上皮癌の分化度は WHO (1971)¹³⁾ の基準に従い、高分化型 (癌胞巣内部に角化した癌真珠の形成がみられ、細胞間橋は比較的明瞭、分裂細胞は少数で、細胞異型性はほとんど認められない)、中等度分化型 (腫瘍細胞の角化や癌真珠の形成は少なく、細胞間橋は不明

Fig. 1 Anatomic site of primary lesion of 51 patients with oral squamous cell carcinoma (1988-1994)

Table 1 Characteristic of 51 patients with oral squamous cell carcinoma (1988-1994)

Sex	Cases	Average age
Male	32(62.7)	60.9
Female	19(37.3)	60.7

() : %

瞭, 細胞分裂は中等度で, 細胞異型性は少ない), 低分化型 (腫瘍細胞の角化や細胞間橋などの分化傾向はみられず, 腫瘍細胞核の異常分裂が多く, 細胞異型性は高度である) の3型とした。また, 浸潤様式は山本・小浜分類 (1982)¹⁴⁾ に従い, 5型に分類した。すなわち, 1型: 腫瘍との境界が明瞭である, 2型: 境界線にやや乱れがある, 3型: 境界線は不明瞭で大小の腫瘍胞巣が散在している, 4C型 (索状型): 境界線は不明瞭で小さな腫瘍胞巣が索状に浸潤, 増殖している, 4D型 (び漫型): 境界線は不明瞭で腫瘍は胞巣をつくらず, び漫性に浸潤, 増殖しているものの5型である。さらに, 組織学的悪性を Jakobsson ら (1973)¹⁵⁾ の基準を参考にした点数評価にて, Grade 1 から Grade 5 までの5段階評価を行い, Grade 1 と Grade 2 を低悪性型, Grade 3 を中等度悪性型, Grade 4 と Grade 5 を高悪性型と評価した。

2) 免疫組織化学的な検索方法

生検および摘出物のスライスを通法のごとく, 脱パラフィン後, 以下の方法にしたがって免疫染色を行った。すなわち, PCNA の免疫染色には一次抗体としてモノクローナル抗増殖細胞核抗体 (PC-10, DAKO 社製) を用い, Peroxidase-antiperoxidase Method (PAP 法) を改良した Labelled Streptavidin Biotin Method (LSAB 法) により, その局在性を検討した。

Table 2 Immunohistochemical methods

なお, PCNA の陽性率は, 腫瘍細胞数約 1000 個以上について, PCNA 抗体陽性細胞数を計数し, その百分率表示をもって, その陽性率とした。また, P53蛋白の検索には一次抗体にモノクローナル抗 P53蛋白抗体 (BP 53-12, 日本ターナー社製) を 100 倍希釈して, 免疫組織染色を行った (Table 2)。陽性判定には山際ら (1993)¹⁶⁾ の基準を参考にして, 腫瘍細胞の少数でも陽性のものがあれば陽性 (+) とし, 染色されないものや不明瞭のものは陰性 (-) とした。

研究成績

A. 臨床的な諸因子

1. TNM 分類

口腔扁平上皮癌 51 症例における TNM 分類 (UICC, 1987)¹⁷⁾ をみると, T 分類では T1 (腫瘍の大きさが 2 cm 以下) が 20 例 (39.2%), T2 (腫瘍の大きさが 2 cm を越え, 4 cm 以下) が 19 例 (37.3%), T3 (腫瘍の大きさが 4 cm を越えるもの) が 5 例 (9.8%), T4 (腫瘍の大きさに関係なく, 腫瘍が隣接組織に浸潤したもの) が 7 例 (13.7%) となり, 4 cm 以下の腫瘍が大部分 (76.5%) を占めていた。また, N 分類では N0 (所属リンパ節に転移を認めない) が 33 例 (64.7%), N1 (患側の所属リンパ節に 3 cm 以下で, 一個の転移が認められる) が 17 例 (33.3%), N2 (患側のリンパ節に 6 cm 以下で, 一個の転移が認められる) が 1 例 (2.0%) で, 約 1/3 の症例に所属リンパ節転移が認められた。なお, M 分類では全症例ともに M0 (遠隔転移を認めない) であった (Table 3)。

2. Stage 分類

口腔扁平上皮癌 51 症例における Stage 分類 (UICC, 1987)¹⁷⁾ をみると, Stage I が 18 例 (35.3%), Stage II が 12 例 (23.5%), Stage III が 13 例 (25.5%), Stage IV が 8 例 (15.7%) となり, Stage I と Stage II の, いわゆる早期癌が多くなっていた (Table 4)。

3. 予後

口腔扁平上皮癌 51 症例について, 治療後再発や転移もなく経過している群 (経過良好群) と治療後再発や転移のみられる担癌患者, あるいは死亡した群 (経過不良群) とに分けて検討した。その結果, 経過良好群が 34 例 (66.7%) であったのに対し, 経過不良群は 17 例 (33.3%) であった (Table 5)。

B. 病理組織学的な諸因子

1. 分化度

口腔扁平上皮癌 51 症例における分化度を H・E 染色

Table 3 T and N classification of 51 patients with oral squamous cell carcinoma (1988-1994)

TNM ¹⁷⁾	Cases
T1	20 (39.2)
T2	19 (37.3)
T3	5 (9.8)
T4	7 (13.7)
N0	33 (64.7)
N1	17 (33.3)
N2	1 (2.0)

() : %

Table 4 Stage classification of 51 patients with oral squamous cell carcinoma (1988-1994)

Stage	Cases
I	18 (35.3)
II	12 (23.5)
III	13 (25.5)
IV	8 (15.7)

() : %

Table 5 Prognosis of 51 patients with oral squamous cell carcinoma (1988-1994)

Prognosis	Cases
Good	34 (66.7)
Poor	17 (33.3)

() : %

標本にて癌巣部の分化度を WHO (1971)¹³⁾ の分類にしたがって検討した。その結果、多数の角化性上皮真珠と細胞間橋の明瞭な高分化型が 35 例 (68.6%) で、上皮真珠がほとんど認められず、腫瘍細胞の角化や細胞間橋の不明瞭な中等度分化型が 14 例 (27.5%)、上皮真珠がなく、個々の腫瘍細胞に角化がほとんどみられず、また細胞間橋の認められない低分化型が 2 例 (3.9%) となり、大部分が高分化型であった (Table 6)。

2. 浸潤様式

口腔扁平上皮癌 51 症例を山本・小浜分類 (1982)¹⁴⁾ にしたがって、腫瘍浸潤様式を検討した。すなわち、1 型は認められず、2 型が 9 例 (17.7%)、3 型が 28 例

Table 6 Tumor differentiation of 51 patients with oral squamous cell carcinoma (1988-1994)

Differentiation	Cases
Well	35 (68.6)
Moderately	14 (27.5)
Poorly	2 (3.9)

() : %

Table 7 Mode of invasion (Y-K classification) of 51 patients with oral squamous cell carcinoma (1988-1994)

Mode of invasion	Cases
Grade 1	0 (0.0)
Grade 2	9 (17.7)
Grade 3	28 (54.9)
Grade 4C	7 (13.7)
Grade 4D	7 (13.7)

() : %

Table 8 Histological grading of malignancy of 51 patients with oral squamous cell carcinoma (1988-1994)

Histological malignancy	Cases
Grading of malignancy	
Grade 1	2 (3.9)
Grade 2	18 (35.3)
Grade 3	18 (35.3)
Grade 4	11 (21.6)
Grade 5	2 (3.9)
Type of malignancy	
Low grade	20 (39.2)
Moderate grade	18 (35.3)
High grade	13 (25.5)

() : %

(54.9%)、4C 型が 7 例 (13.7%)、4D 型が 7 例 (13.7%) となり、腫瘍の境界線が不明瞭で、大小の腫瘍胞巣が散在 (3 型) しているか、あるいは腫瘍胞巣が索状あるいはび慢性に浸潤、増殖 (4C、4D 型) しているものが多くみられた (Table 7)。

3. 組織学的悪性度

口腔扁平上皮癌 51 症例における組織学的悪性度は

Grade 1 が 2 例 (3.9%), Grade 2 が 18 例 (35.3%), Grade 3 が 18 例 (35.3%), Grade 4 が 11 例 (21.6%), Grade 5 が 2 例 (3.9%) で, Grade 2 および Grade 3 が大部分を占めていた. また, Grade 1, Grade 2 の低悪性型が 20 例 (39.2%), Grade 3 の中等度悪性型が 18 例 (35.3%), Grade 4, Grade 5 の高悪性型が 13 例 (25.5%) であった (Table 8).

以下, これらの臨床的ならびに病理組織学的な因子について, PCNA と p53 蛋白の発現との免疫組織化学的な関連性を検討した.

C. 免疫組織化学的な成績

1. PCNA の局在

口腔扁平上皮癌 51 症例のうち, 全症例の癌組織内に PCNA 陽性細胞が認められた. しかしながら, PCNA 陽性細胞では核内で網状に反応している弱陽性の腫瘍細胞と, 網状かつ顆粒状に反応している強陽性の腫瘍細胞とが混在していた.

一方, PCNA 陽性細胞の局在様式をみると, 分化度の高い腫瘍胞巣では, 角化を示した細胞に PCNA 陽性細胞は認められず, その周囲の腫瘍細胞の陽性所見がみ

Photo. 1 Well differentiated type of oral squamous cell carcinoma
a : H·E stain (×148), b : positive satining with p53 protein (×148)
c : positive staining with PCNA (×148)

Photo. 2 Moderately differentiated type of oral squamous cell carcinoma
a : H·E stain (×148), b : positive satining with p53 protein (×148)
c : positive staining with PCNA (×148)

Photo. 3 Poorly differentiated type of oral squamous cell carcinoma
a : H·E stain (×148), b : positive satining with p53 protein (×148)
c : positive staining with PCNA (×148)

られた。また、分化度の低い腫瘍胞巣では、全般的に PCNA 陽性細胞が認められた。さらに、腫瘍胞巣が散在性あるいは索状に浸潤しているものでは、腫瘍胞巣周辺部の腫瘍細胞に PCNA 陽性細胞が多数認められた。なお、腫瘍胞巣の境界が不明瞭、あるいは腫瘍胞巣を形成せず、間質内にび漫性に浸潤しているものでは、大部分の腫瘍細胞が PCNA 陽性を示していた。

2. p53蛋白の局在

口腔扁平上皮癌における p53蛋白は、腫瘍細胞の核内に褐色ないしは茶褐色で、微小な顆粒状を呈する細胞核と核全体に濃染する細胞とが混在していた。また、p53蛋白の局在様式をみると、分化度の高い扁平上皮癌では角化部の細胞核に染色されず、むしろその周囲にみられる腫瘍細胞核に陽性を示していた。一方、分化度の低い扁平上皮癌、あるいは散在性や浸潤性に増殖している腫瘍細胞では、その胞巣内にび漫性に陽性を示す細胞が多くみられた。

PCNA と p53蛋白の腫瘍組織内における局在性の関連をみると、PCNA が陽性で p53蛋白が陽性を示す細胞は比較的少ない傾向が認められたが、それぞれの分布様式と分布範囲の傾向は類似していた (Photo. 1-9)。

3. PCNA 陽性率と p53蛋白の陽性率

口腔扁平上皮癌 51 症例の PCNA 陽性率は、 $34.7 \pm 12.0\%$ ($n=51$) で、正常口腔粘膜上皮における PCNA 陽性率は $3.9 \pm 2.1\%$ ($n=10$) となり、統計学的にも著しい有意差が認められた ($p<0.01$)。また、p53蛋白の陽性率は 54.9% (28/51 例) であった (Table 9)。

4. p53蛋白と PCNA 陽性率との関連性

一方、PCNA の陽性率と p53蛋白との関連をみると、p53蛋白陽性細胞の PCNA 陽性率は $37.9 \pm 11.9\%$ ($n=28$) であったのに対し、p53蛋白陰性細胞での PCNA 陽性率は $30.8 \pm 11.1\%$ ($n=23$) となり、p53蛋白陽性細胞の PCNA 陽性率は有意に高くなっていた ($p<0.05$, Fig. 2)。

1) 臨床的な因子における p53蛋白と PCNA 陽性率

a) 腫瘍の大きさ (T 分類)

T 分類をみると、T1 における p53蛋白陰性細胞 (以

Fig. 2 Relation between PCNA and p53 protein in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

Fig. 3 Relation between PCNA and p53 protein according to T1 in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

Table 9 Expression of PCNA and p53 protein of 51 patients with oral squamous cell carcinoma (1988-1994)

PCNA score	$34.7 \pm 12.0\%$ ($n=51$)	] ($p<0.01$)
(Normal)	$3.9 \pm 2.1\%$ ($n=10$)	
p53 score	54.9% (28/51 cases)	

下, p53 (-) と略す) の PCNA 陽性率 (以下, PCNA-R と略す) は $27.3 \pm 7.8\%$ ($n=7$), p53 蛋白陽性細胞 (以下, p53 (+) と略す) の PCNA-R は $36.8 \pm 10.6\%$ ($n=13$) となり, p53 (+) の PCNA 陽性率が有意に高くなっていた ($p < 0.05$, Fig. 3). また, T2 における p53 (-) の PCNA-R は $28.1 \pm 12.2\%$ ($n=9$), p53 (+) の PCNA-R は $35.8 \pm 13.5\%$ ($n=10$) で, T3 における p53 (-) の PCNA-R は $38.3 \pm 13.7\%$ ($n=3$), p53 (+) の PCNA-R は $51.4 \pm 6.2\%$ ($n=2$) で, T4 における p53 (-) の PCNA-R は $37.2 \pm 9.6\%$ ($n=4$), p53 (+) の PCNA-R は $40.5 \pm 13.4\%$ ($n=3$) となり, 症例数が少ないため明らかな有意差はみられなかったものの, 腫瘍の大きさによる PCNA 陽性率は p53 蛋白の発現している症例のほうが高くなる傾向を示していた。

b) 所属リンパ節転移 (N 分類)

N 分類では, リンパ節転移のみられない N0 (以下, N (-) と略す) において p53 (-) の PCNA-R が $29.2 \pm 10.8\%$ ($n=16$) であったのに対し, p53 (+) の PCNA-R は $36.9 \pm 12.2\%$ ($n=17$) となり, 統計学的に有意差が認められた ($p < 0.05$). また, リンパ節転移のみられた N1 および N2 (以下, N (+) と略す) における p53 (-) の PCNA-R は $34.3 \pm 11.7\%$ ($n=7$), p53 (+) の PCNA-R は $39.5 \pm 11.9\%$ ($n=11$) で, 有意な差異は認められなかった。しかしながら, N (+) における p53 (+) の PCNA-R は, N (-) における p53 (-) の PCNA-R に比べ有意に高いことから ($p < 0.05$), 所属リンパ節転移に p53 蛋白および PCNA の関与する傾向が認められた (Fig. 4, 5)。

c) 病期 (Stage 分類)

病期の進行度別にみると, Stage I における p53 (-) の PCNA-R は $27.3 \pm 7.8\%$ ($n=7$), p53 (+) の PCNA-R は $37.5 \pm 11.5\%$ ($n=11$) で, また, Stage II における p53 (-) の PCNA-R は $29.9 \pm 13.4\%$ ($n=7$), p53 (+) の PCNA-R は $37.9 \pm 15.2\%$ ($n=5$) となり, それぞれ統計学的な有意差が認められた ($p < 0.01$, $p < 0.05$, Fig. 6, 7). しかしながら, Stage III における p53 (-) の PCNA-R は $31.7 \pm 13.4\%$ ($n=5$), p53 (+) の PCNA-R は $39.4 \pm 11.8\%$ ($n=8$) で, さらに Stage IV における p53 (-) の PCNA-R は $37.2 \pm 9.6\%$ ($n=4$), p53 (+) の PCNA-R は $36.1 \pm 14.1\%$ ($n=4$) となり, それぞれ統計学的な有意差はみられなかった。

d) 予後

Fig. 4 Relation between PCNA and p53 protein according to N0 in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

Fig. 5 Relation between PCNA and p53 protein according to N classification in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

口腔扁平上皮癌 51 症例を経過良好群 (以下, P (-) と略す) および経過不良群 (以下, P (+) と略す) とに分類し, それぞれの p53 蛋白と PCNA の陽性率を検討した。その結果, P (-) において p53 (-) の PCNA-R は $28.4 \pm 9.1\%$ ($n=16$), p53 (+) の PCNA-R は $35.7 \pm 11.4\%$ ($n=18$) であった。また, P (+) における p53 (-) の PCNA-R は $37.8 \pm 14.4\%$ ($n=7$), p53 (+) の PCNA-R は $41.8 \pm$

Fig. 6 Relation between PCNA and p53 protein according to Stage I in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

Fig. 8 Relation between PCNA and p53 protein according to good prognosis in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

Fig. 7 Relation between PCNA and p53 protein according to Stage II in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

Fig. 9 Relation between PCNA and p53 protein according to poor prognosis in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

12.5% (n=10) となり、それぞれ有意差は認められなかった。しかしながら、p53蛋白が陽性でしかもPCNA陽性率の高い症例は経過不良であるという傾向がみられた (Fig. 8, 9)。

2) 組織学的な因子における p53蛋白と PCNA 陽性率

a) 分化度

分化度別による検討では、高分化型において p53

(-) の PCNA-R は $28.1 \pm 10.6\%$ (n=16), p53 (+) の PCNA-R は $36.0 \pm 10.4\%$ (n=19) となり、統計学的に有意差が認められた ($p < 0.05$, Fig. 10)。しかしながら、中等度分化型における p53 (-) の PCNA-R は $34.6 \pm 8.9\%$ (n=6), p53 (+) の PCNA-R は $41.4 \pm 16.8\%$ (n=8) となり、明らかな有意差はみられなかった。

b) 浸潤様式

Fig.10 Relation between PCNA and p53 protein according to well differentiated type in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

浸潤様式をみると、2型における p53 (-) の PCNA-R は $30.2 \pm 6.0\%$ ($n=3$), p53 (+) の PCNA-R は $32.3 \pm 13.6\%$ ($n=6$) で、3型における p53 (-) の PCNA-R は $30.3 \pm 12.0\%$ ($n=16$), p53 (+) の PCNA-R は $36.5 \pm 11.1\%$ ($n=12$) となり、それぞれ統計学的な有意差は認められなかった。一方、4Cにおける p53 (-) の PCNA-R は $25.6 \pm 4.2\%$ ($n=2$), p53 (+) の PCNA-R は $44.6 \pm 12.4\%$ ($n=5$) となり、有意差がみられたが ($p < 0.05$, Fig. 11), 4Dにおける p53 (-) の PCNA-R は $40.5 \pm 14.8\%$ ($n=2$), p53 (+) の PCNA-R は $41.3 \pm 10.5\%$ ($n=5$) となり、差異は認められなかった。

c) 組織学的悪性度

口腔扁平上皮癌 51 症例について、Jakobsson ら (1973)¹⁵⁾ の基準を一部改変した評価法にて悪性度を 5 段階評価し検討した。その結果、Grade 2 における p53 (-) の PCNA-R は $30.5 \pm 13.1\%$ ($n=10$), p53 (+) の PCNA-R は $33.9 \pm 13.5\%$ ($n=8$) で、有意差はみられなかった。また、Grade 3 における p53 (-) の PCNA-R は $28.9 \pm 8.8\%$ ($n=10$), p53 (+) の PCNA-R は $39.4 \pm 9.2\%$ ($n=8$) となり、統計学的な有意差がみとめられた ($p < 0.05$, Fig. 12)。さらに、Grade 4 における p53 (-) の PCNA-R は $31.4 \pm 4.0\%$ ($n=2$), p53 (+) の PCNA-R は $40.0 \pm 11.8\%$ ($n=9$) となり、明らかな有意差はみられなかった。そこで、これらの組織学的悪性度を低悪性型 (Grade

Fig.11 Relation between PCNA and p53 protein according to 4C (Y-K classification) in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

Fig.12 Relation between PCNA and p53 protein according to grade 3 histological malignancy in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

1, Grade 2), 中等度悪性型 (Grade 3), 高悪性型 (Grade 4, Grade 5) の 3 段階に区分して検討した。すなわち、低悪性型において p53 (-) の PCNA-R は $30.5 \pm 13.1\%$ ($n=10$), p53 (+) の PCNA-R は $33.0 \pm 13.0\%$ ($n=10$) となり、差異はみられなかった。また、中等度悪性型における p53 (-) の PCNA-R は $28.9 \pm 8.8\%$ ($n=10$), p53 (+) の PCNA-R は $39.4 \pm 9.2\%$ ($n=8$) で、有意差が認められた ($p < 0.05$)。

さらに、高悪性型における p53 (-) の PCNA-R は $37.9 \pm 11.7\%$ ($n=3$), p53 (+) の PCNA-R は $41.5 \pm 12.2\%$ ($n=10$) となり、明らかな有意差はみられなかった。一方、中等度悪性型および高悪性型における p53 (+) の PCNA-R は、低悪性型で p53 (-) の PCNA-R に比べ、明らかな有意差が認められた ($p < 0.01$, $P < 0.05$, Fig. 13, 14). また、低悪性型における

p53 (+) の PCNA-R と高悪性型における p53 (+) の PCNA-R, さらに、中等度悪性型における p53 (-) の PCNA-R と高悪性型における p53 (+) の PCNA-R とに、それぞれ統計学的に有意な差異が認められた ($p < 0.01$, $p < 0.05$, Fig. 15, 16). したがって、組織学的な悪性度では悪性度が高くなるにつれて、p53 蛋白と PCNA の関与が強くなる傾向がみられた。

総括ならびに考察

ヒトの様々な癌細胞において、細胞分子生物学の進歩にともない、癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子の変化が検出され、癌の発生や進展の機構が解明されつつある¹⁸⁻²²⁾。とくに、癌抑制遺伝子である p53 の変異は大腸癌^{23, 24)}、肺癌^{11, 25, 26)}、乳癌²⁷⁾をはじめとする各種のヒト癌細胞において高率に認められ^{28, 29)}、重要な遺伝子変化と考えられている。

p53 蛋白はその産物が DNA 腫瘍ウイルス SV40 の T 抗原と結合する細胞蛋白質として同定され、癌遺伝子と考えられていた⁹⁾が、正常型 p53 遺伝子の機能に関する研究成績から、癌抑制遺伝子である可能性が示唆された^{10, 11)}。すなわち、p53 遺伝子が存在する第 17 染色体短腕の欠失と、残存するもう一方の対立する p53 遺伝子に点突然変異が検出され、さらに、異常として検出された変化は、遺伝子の欠失や点突然変異のみならず、mRNA や p53 蛋白の減少などが認められ、癌抑制遺伝子として位置づけられている¹¹⁾。

Fig. 13 Relation between PCNA and p53 protein according to moderate grade histological type of malignancy in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

Fig. 14 Relation between PCNA and p53 protein according to histological type of malignancy in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

p53遺伝子には正常細胞にみられる野性型の p53蛋白と、癌細胞にみられる変異型の p53蛋白とが認められている⁹⁻¹¹⁾。また、癌化の過程において p53遺伝子の欠失と点突然変異の二段階の変異が起こっているとされ¹¹⁾、変異型の p53遺伝子は野性型の p53遺伝子が有する癌抑制活性を喪失しており、癌化に深く関与するのみならず、癌の浸潤、増殖にも関連することが示唆されている^{11, 28, 29)}。

Fig.15 Relation between PCNA and p53 protein according to histological type of malignancy in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

Fig.16 Relation between PCNA and p53 protein according to histological type of malignancy in oral squamous cell carcinoma (1988-1994, 51 cases)

一方、変異型の p53蛋白は DNA ウイルス産生蛋白などとの複合結合により、細胞内により安定した状態で蓄積するものと考えられている⁹⁾。また、野性型の p53蛋白の半減期は 20 分前後であるのに対し、変異型の p53蛋白は 1.5 時間～7 時間と長く、抗 p53抗体によって認識される核内蛋白質は野性型 p53蛋白ではなく、変異型 p53蛋白と考えられている⁹⁻¹¹⁾。したがって、変異型の p53蛋白が生理的に細胞内で他の因子にどのような作用を与え細胞増殖の制御に関与するのかは、癌化機構を考える上で重要な問題と思われる。

一方、悪性腫瘍において、細胞レベルにおける腫瘍細胞の増殖能は悪性腫瘍患者の予後に影響を与える重要な因子とされている¹⁻⁴⁾。これまでに腫瘍増殖能を解明するために、さまざまな研究がなされ^{3, 4, 30, 31)}、その代表的なものとして、1) thymidine analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みにより、S 期細胞を検出する BrdU 法^{5, 6)}、2) cycling cell の核に存在する Ki-67 抗原を利用する Ki-67 法⁵⁾、3) 核 DNA 量を測定後、ヒストグラムを作成して、細胞回転を推定する方法³²⁾、4) ³H-thymidine を用いたオートラジオグラフィ法³³⁾、5) DNA polymerase α などの増殖細胞関連抗原に対する免疫組織化学染色法⁷⁾、6) nucleolar organizer regions に対する銀コロイド染色法 (AgNORs)³⁴⁾、7) フローサイトメトリーを用いた腫瘍細胞中の S 期細胞比率の解析法³⁵⁾などが実施されている。しかしながら、これらの方法では、組織の状態や条件などの制約があり、必ずしも日常の検査法としては一般的とはいえない。そこで、近年、パラフィン包埋標本においても染色可能な PCNA モノクローナル抗体が開発され、各分野で細胞動態の解析に繁用されている^{4, 30)}。

PCNA は増殖関連抗原の 1 つで、S 期の細胞において急激に増加する分子量 36kDa の核蛋白 (cyclin) と同一で、さらに DNA 合成に重要な役割を演ずる DNA polymerase δ の補助蛋白であることが明らかにされている³⁶⁻³⁸⁾。また、PCNA は G0 期にはほとんど認められないが、G1 期の後期に核小体を中心に出現し、S 期には核全体に認められ、S 期以降は消失するとされている³⁹⁾。Garicia ら (1989)³⁵⁾ は、PCNA 陽性細胞率とフローサイトメトリーによって算出された S 期細胞の割合が、一般的にはよく相関していたと報告している。また、PCNA 陽性細胞と S 期細胞との間には、高い相関性を示唆する報告が多くみられ、PCNA は悪性腫瘍の増殖能を推測するための重要な指標になり得ると考えられている⁴⁰⁾。

p53蛋白および PCNA の局在性について

変異型 p53蛋白の局在性は、癌細胞の核内に褐色あるいは茶褐色の顆粒状に染色され、とくに口腔扁平上皮癌では浸潤部の基底細胞層を中心とした核内に、広範囲に陽性を示す細胞が多数認められると報告されている⁴¹⁻⁴⁴⁾。また、分化傾向が低く、浸潤傾向の強い腫瘍細胞の胞巣内に散在性あるいはび漫性にみられるとされている⁴¹⁻⁴⁴⁾。

一方、PCNA 陽性細胞は、口腔扁平上皮癌胞巣の周辺部で染色され、その核質が濃く染色されるものと淡く染色されるものとが混在しており、濃く染色されるものが S 期の細胞で、淡く染色されるものはそれ以外の細胞周期を示すと考えられている^{45, 46)}。また、Gilbert ら (1989)⁴⁶⁾ の報告では、PCNA は S 期細胞だけでなく、他の細胞周期にも認められると報告している。また、辻ら (1992)⁴⁾ も PCNA の染色性を BrdU 法や Ki-67 法と比較し、cell cycle にあるすべての細胞と反応する Ki-67 陽性率が PCNA 陽性率に近似していたことから、PCNA 陽性細胞は S 期には限定されないと述べている。

本研究では、p53蛋白は口腔扁平上皮癌の細胞核内に褐色ないしは茶褐色で、微小な顆粒状を呈するものと、核全体に濃染する細胞とが混在していた。また、分化度の高い傾向を示す扁平上皮癌では、胞巣周辺部の腫瘍細胞核にのみ陽性細胞がみられ、分化傾向の低い胞巣ではび漫性に陽性を示す腫瘍細胞が認められた。一方、PCNA の局在性は、癌組織内の全例にみられたが、分化傾向の高い腫瘍胞巣では、その周囲の腫瘍細胞に陽性所見が認められ、分化度の低い腫瘍細胞では、全般的に散在性の陽性細胞がみられた。

p53蛋白と PCNA との部位的な相関性について、西岡ら (1993)⁴²⁾ は p53蛋白陽性症例では PCNA 強陽性であったとし、変異型の p53蛋白が口腔扁平上皮癌細胞の細胞周期を上昇させて、より悪性化を促進している可能性を示唆していると述べている。しかしながら、辻ら (1993)⁴⁴⁾ は p53蛋白と PCNA の両者ともに陽性である症例では分布範囲と分布様式が類似していたが、p53蛋白陽性細胞の方が PCNA 陽性細胞よりも少ない傾向がみられたと報告している。本研究でも、PCNA 陽性細胞のうち、p53蛋白が陽性を示す腫瘍細胞は比較的少ない傾向を認めたが、それぞれの分布様式と分布範囲は比較的よく類似していた。また、野性型 p53蛋白の誘導によって、DNA polymerase δ の補助因子である PCNA の mRNA の発現が特異的に抑制され、細胞周期は G1 期から S 期で可逆的に停止することが示されてい

ること^{44, 47)}、さらに変異型の p53蛋白は転写を活性化しないことなど⁹⁻¹¹⁾からすれば、変異型の p53蛋白が癌の細胞周期を促進ないしは調節しているものと考えられた。

p53蛋白の陽性率と PCNA 陽性率について

口腔扁平上皮癌における p53蛋白の陽性率について、それぞれの施設において使用した抗体の種類、濃度、作用時間などに差異、あるいは判定方法の相違がみられるが、34.0% から 52.5% に認められている⁴¹⁻⁴⁴⁾。本研究では 54.9% に p53蛋白の陽性例が認められ、高い陽性率を示していた。一方、PCNA 陽性率については、数多くの報告がみられ、その陽性率は報告者によって、さまざまである^{48, 49)}。すなわち、前田ら (1991)⁴⁸⁾ は 0.8% ~ 23.3% と変動域がみられたが、その平均は $11.2 \pm 0.98\%$ であったと報告し、辻ら (1992)⁴⁾ は口腔白板症が $16.7 \pm 2.2\%$ であったのに対し、口腔扁平上皮癌では $22.8 \pm 2.0\%$ であったと報告している。本研究では、PCNA 陽性率は正常口腔粘膜上皮が $3.9 \pm 2.1\%$ で、口腔扁平上皮癌が $34.7 \pm 12.0\%$ であった。したがって、口腔扁平上皮癌細胞は正常口腔粘膜細胞に比べ、明らかに浸潤、増殖能の旺盛な細胞が多いと思われる。p53蛋白と PCNA における陽性率の関係をみると、大野 (1993)²⁸⁾ は胃癌において、p53蛋白の発現例での PCNA 陽性率は $68.8 \pm 17.4\%$ で、非発現例での $53.6 \pm 18.0\%$ に比べ有意に高く認められ、p53蛋白の発現例は高い増殖能を有すると考えられると述べている。また、西岡ら (1993)⁴²⁾ は口腔扁平上皮癌において、p53蛋白陽性症例のほとんどが PCNA 強陽性であったと報告している。本研究でも、p53蛋白陽性例での PCNA は $36.8 \pm 10.6\%$ で、p53蛋白陰性例の PCNA は $27.3 \pm 7.8\%$ となり、明らかな有意差がみられたことから、p53蛋白と増殖能を客観的に示す PCNA とに関連性を認め、p53蛋白陽性例は高い増殖能を示していた。

臨床的な諸因子との関連性について

臨床的な諸因子との関連性について、山口ら (1992)²³⁾ は大腸癌において、p53蛋白陽性例が陰性例に比べ、予後不良となっていたことは腫瘍の増殖率が高いことに起因すると推察している。また、石戸谷ら (1993)⁴³⁾ は p53蛋白の T 分類では腫瘍が大きくなるにつれて、陽性率が増加していたが、N 分類ではリンパ節転移の有無に関係はみられず、また Stage 分類においても関連性が認められなかったこと、さらに、p53蛋白の陽性例と PCNA 陽性例とに関連性がみられなかったことから、PCNA 陽性として示される細胞の増殖能の獲得と p53

蛋白の異常とは別の現象と考えられると述べている。さらに、辻ら (1993)⁴⁰⁾ は増殖期の細胞に p53蛋白が検出されたことから、p53蛋白と PCNA との関連性が示唆されるが、p53蛋白が全例に検出されるわけではなく、細胞動態と密接に関連しているとは考えにくいと述べている。本研究では、T 分類をみると、比較的小さな腫瘍においてその増殖能が高いことが示された。また、所属リンパ節転移では、p53蛋白および PCNA 陽性症例において高い転移率を示していた。さらに、予後をみると、両者が陽性である症例では経過不良となる傾向が認められた。したがって、p53蛋白と PCNA とは何らかの関連性のあることが示唆され、口腔扁平上皮癌の進行過程において旺盛な増殖能を獲得し、さらには、転移能に関与しているものと考えられた。

組織学的な諸因子との関連性について

腫瘍の組織学的な悪性度については、腫瘍本来の増殖能を考慮して局所の再発や転移、あるいは経過や予後の推測が可能で、重要な因子と考えられる。Robbins ら (1987)⁵⁰⁾ は全身の悪性腫瘍のうち、PCNA 陽性細胞の比率は核分裂像の数や組織学的な悪性度とよく関連していたと報告し、Dawson ら (1990)⁵¹⁾ は 54 例の肺癌のうち、高分化型の腫瘍よりも中等度分化型の腫瘍のほうが PCNA 陽性率が高かったと報告している。また、前田ら (1991)⁴⁸⁾ は口腔扁平上皮癌において、PCNA 陽性率は腫瘍細胞の分化度や腫瘍細胞異型度と有意な相関性がみられたと述べている。さらに、藤井ら (1992)⁵²⁾ は肺非小細胞癌において、組織学的分化度との関係では、分化度が低くなるにほど PCNA 陽性細胞の割合が増加傾向にあり、血管侵襲が強くなるにしたがって PCNA 陽性細胞が高率となっていたと報告している。このように、PCNA 陽性率は臨床的な病期とは無関係で、むしろ組織学的悪性度との相関性が認められている。一方、p53蛋白は組織学的な分化度とは相関せず、むしろ、浸潤様式との関連性が示唆されている⁴²⁾。また、高悪性型の症例に多いとする報告もみられる。本研究では、分化度における明らかな差異は認められず、口腔扁平上皮癌の分化度には p53蛋白および PCNA は関与しないものと思われた。また、浸潤様式において、小さな腫瘍胞巣が索状に浸潤、増殖している腫瘍では、p53蛋白および PCNA 陽性例が多く、p53蛋白および PCNA が腫瘍の浸潤、増殖に何らかの関連性を有していることが示唆された。一方、組織学的な悪性度をみると、悪性度が高くなるにつれて、p53蛋白および PCNA 陽性細胞が増加していたことから、p53蛋白および PCNA が口腔扁平

上皮癌細胞の細胞周期に何らかの影響を与え、悪性化を促進している可能性が示唆された。

以上の研究成績からすれば、p53蛋白および PCNA を解析するにあたって、腫瘍を構成する細胞集団を個々に客観的に検討する必要がある、組織学的な因子を組み合わせた正確な悪性度の評価を行うことは、合理的な治療法の選択と、経過や予後を推定するのに有用な糧となると思われる。また、両者の陽性率が腫瘍の大きさや転移能、さらには浸潤様式、組織学的悪性度とよく相関していたことから、浸潤、増殖能における判定の指標に極めて有用と考えられる。

結 論

1988 年から 1994 年までの過去 7 年間に、当科を受診し、病理組織学的に口腔扁平上皮癌と確定診断され、加療を行った 51 例 (一次症例) について、抗 p53抗体および PCNA 抗体を用いた免疫組織化学的な検索を行い、以下の成績を得た。

1) p53蛋白陽性例での PCNA 陽性率は $37.9 \pm 11.9\%$ ($n = 28$)、p53蛋白陰性例の PCNA 陽性率は $30.8 \pm 11.1\%$ ($n = 23$) となり、明らかな有意差が認められた ($p < 0.01$)。

2) p53蛋白の発現と PCNA 陽性細胞の局在は、分布様式および分布範囲が類似していた。

3) 口腔扁平上皮癌における p53蛋白および PCNA 陽性例は、臨床的な TNM 分類や予後などとの関連性を認めた。

4) p53蛋白および PCNA 陽性例は腫瘍の組織学的な分化度との関連性を認めず、浸潤様式では 4C 型、4D 型との関連性が認められた。

5) p53蛋白および PCNA 陽性例は、口腔扁平上皮癌の組織学的悪性度をよく反映していた。

以上の研究成績から、p53蛋白および PCNA 陽性反応は口腔扁平上皮癌において、腫瘍の浸潤、増殖能、悪性度の評価に極めて有用であると考えられる。

稿を終えるにあたり、本研究に終始ご懇切なるご指導とご校閲を賜った恩師梶山 稔教授に深甚なる感謝の意を表わします。また、種々のご教示とご協力を戴いた黒川英雄助教授に感謝し、さらに、教室員諸兄に謝意を表わします。

引用文献

- 1) 黒川英雄, 梶山 稔, 山野貴教, 野村信人, 児玉高広, 林

- 嘉仁, 末永一郎, 迫 正信, 赤間 功: 口腔領域における悪性腫瘍患者の CEA についての検討. 日口外誌 31: 2113-2119, 1985.
- 2) 黒川英雄, 津留昭二, 野村俊夫, 有松正豊, 末森一利, 山本広邦, 鳥羽英紀, 梶山 稔: 口腔扁平上皮癌における腫瘍マーカーの臨床的検討—Combination assay について— 癌の臨床 37: 602-607, 1991.
- 3) 西村令喜, 長尾和治, 宮山東彦, 松田正和, 馬場憲一郎, 松岡由紀夫, 上野洋一, 山下裕也, 一口 修, 宮本大典, 石原 明: 乳癌における DNA polymerase α を用いた増殖能の臨床・病理学的検討—とくに予後との関連について— 癌の臨床 38: 1195-1199, 1992.
- 4) 辻 龍雄, 佐々木功典, 木村由香, 前田寛治, 金川昭啓, 井上 敬, 早津良和, 篠崎文彦: 増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織染色における問題点. 日口外誌 38: 1055-1058, 1992.
- 5) Morstyn, G., Husu, S. M. and Kinsella, T.: Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. J. Clin. Invest. 72: 1844-1850, 1983.
- 6) 佐々木功典, 荻野哲朗, 村上知之: モノクローナル抗 BrdU 抗体を利用した人癌組織の標識率測定法. 病理と臨床 3: 565-567, 1985.
- 7) Sasaki, K. and Takahashi, M.: Preservation of cell cycle characteristics in solid *in vitro*. Cancer Res. 40: 4810-4812, 1980.
- 8) Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. and Stein, H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation. Int. J. Cancer 31: 13-20, 1983.
- 9) 大川恵三, 横田 淳: 癌抑制への情報伝達系—p53 と癌化. 実験医学 13: 1717-1720, 1991.
- 10) 宮本美知子: p53. 医学のあゆみ 171: 380-382, 1994.
- 11) 高橋 隆: 肺癌における p53 遺伝子異常. 医学のあゆみ 171: 483-485, 1994.
- 12) Coltrera, M. D., Zarbo, R. J., Sakr, W. A. and Gown, A. M.: Markers for dysplasia of the upper aerodigestive tract. —Suprabasal expression of PCNA, p53, and CK19 in alcohol-fixed, embedded tissue. Am. J. Pathol. 141: 817-825, 1992.
- 13) Washi, P. N., Cohen, B., Luthra, U. K. and Torloni, H.: Histological typing of oral and oropharyngeal tumors. WHO, Geneva, 1971, 17-18.
- 14) 山本悦秀, 砂川 元, 小浜源郁: び慢性浸潤型口腔扁平上皮癌に関する研究. 日口外誌 28: 1471-1479, 1982.
- 15) Jakobsson, P. A., Eneroth, C. M., Killander, D., Moberger, G. and Martensson, B.: Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. Acta. Radiol. 12: 1-7, 1973.
- 16) 山際裕史, 西井宗男, 大西信行, 大西長久: 胃の ATP, 癌における PCNA と EGFR, c-erbB-2, p53 の免疫組織化学的染色性の関連について. 三重医学 37: 437-440, 1993.
- 17) Hermanek, P. and Sobin, L. H.: UICC international union against cancer. TNM classification of malignant tumors. Forth. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris and Tokyo, 1987, 13-18.
- 18) Scott, N., Sagar, P., Stewart, J., Blair, G. E., Dixon, M. F. and Quirke, P.: p53 in colorectal cancer; clinicopathological correlation and prognostic significance. Br. J. Cancer 63: 317-319, 1991.
- 19) Purdie, C. A., Ogrady, J., Piris, J., Wyllie, A. H. and Bird, C. C.: p53 expression in colorectal tumors. Am. J. Pathol. 138: 807-813, 1991.
- 20) Gusterson, B. A., Anbazhagan, R., Warren, W., Midgely, C., Lane, D. P., Ohare, M., Stamps, A., Carter, R. and Jayatilake, H.: Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. Oncogene. 6: 1785-1789, 1991.
- 21) Sakai, E. and Tsuchida, N.: Most human squamous cell carcinoma in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. Oncogene. 7: 927-933, 1992.
- 22) Ogden, G. R., Kiddie, R. A., Lunny, D. P. and Lane, D. P.: Assessment of p53 protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. J. Pathol. 166: 389-394, 1992.
- 23) 山口明夫, 伏田幸夫, 黒阪慶幸, 神野正博, 米村 豊, 宮崎逸夫: 大腸腫瘍における癌抑制遺伝子 p53 の発現と悪性度. 日外会誌 93: 1312-1316, 1992.
- 24) 宮内基博, 越川信子, 玉 市農, 丸内孝士: 舌, 食道, 胃, 大腸の良性および悪性腫瘍における PCNA, p53, BM-1 反応性蛋白の発現の臓器特異性. 癌の臨床 39: 1773-1780, 1993.
- 25) Saundaresan, G., Ganly, P., Hasleton, P., Rudd, R., Sinha, G., Bleehe, N. M. and Rabbitts, P.: p53 and Chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. Oncogene. 7: 1989-1997, 1992.
- 26) Hiyoshi, H., Matsuno, Y. and Kato, H.: Clinicopathological significance of nuclear accumulation of tumor suppressor gene p53 product in primary lung cancer. Jpn. J. Cancer Res. 83: 101-106, 1992.
- 27) Iwaya, K., Tsuda, H. and Hiraide, H.: Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. Jpn. J. Cancer Res. 82: 835-840, 1991.
- 28) 大野博之: ヒト胃癌組織における癌抑制遺伝子 p53 の発現に関する免疫組織学的検討. 東医大誌 51: 153-163, 1993.
- 29) 永井宣隆, 村上隆浩, 藤本英夫, 大浜紘三: 子宮頸部腺癌における HPV16 型, 18 型感染と癌抑制遺伝子 p53 蛋白の検出. 癌の臨床 40: 1219-1226, 1994.
- 30) 守内哲也, 和泉伸一: PCNA (DNA ポリメラーゼ δ 補助蛋白質). 細胞 21: 99-103, 1989.

- 31) 松野吉宏, 向井 清: 増殖細胞核抗原 (PCNA). 病理と臨床 9: 879-883, 1991.
- 32) 岩井正行: 舌扁平上皮癌の顕微蛍光測光法による核 DNA 量の解析とその臨床的意義. 札幌医誌 54: 195-214, 1985.
- 33) Malaise, E. P., Chavaudra, N. and Tubunana, M.: The relationship between growth rate, labelling index and histological type of human solid tumours. Eur. J. Cancer 9: 305-312, 1983.
- 34) Ploton, D., Menager, M., Deannesson, P., Pigeon, F. and Adnet, J. J.: 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.
- 35) Garcia, R. L., Coltrera, M. D. and Gown, A. M.: Analysis of proliferative grade using Anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Am. J. Pathol. 134: 733-739, 1989.
- 36) Brabo, R. and Celis, J. E.: A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell of Hella cells. J. Cell. Biol. 84: 795-802, 1980.
- 37) Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza, B.R. and Gallels, J. I.: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature 309: 674-676, 1984.
- 38) Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A. and MacDonald, B. H.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase alpha. Nature 326: 515-517, 1987.
- 39) Takazaki, Y., Deng, J. S. and Tan, E. M.: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation. J. Exp. Med. 154: 1899-1909, 1981.
- 40) Battersby, S. and Anderson, T. J.: Correlation of proliferative activity in breast tissue using PCNA cyclin. Hum. Pathol. 21: 781-782, 1990.
- 41) 新谷 悟, 松村智弘, 坂井義春: 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.
- 42) 西岡博人, 上林豊彦, 桐田忠昭, 堀内敬介, 中橋一裕, 堀内克啓, 杉村正仁, 松田博文, 北堀吉映, 日浅義雄: 口腔扁平上皮癌における p53 癌抑制遺伝子産物の免疫組織化学的検索: PCNA 染色との比較および臨床病理学的関連性について. 日口外誌 39: 201-206, 1993.
- 43) 石戸谷 淳一, 鳥山 稔, 小口直彦, 清水信義: 頭頸部扁平上皮癌における癌抑制遺伝子 p53 の異常発現. 頭頸部腫瘍 19: 166-170, 1993.
- 44) 辻 龍雄, 文 樹民, 金川昭啓, 木村由香, 葛山司, 伊田正道, 篠崎文彦: p53 癌抑制遺伝子関連抗原と増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織学的発現と DNA aneuploidy との関連性について. 日口外誌 39: 1330-1333, 1993.
- 45) Gilbert, F. M. and Michael, B. M.: Regulation of proliferating cell nuclear antigen. J. Biol. Chem. 264: 13856-13864, 1989.
- 46) 佐々木功典, 村上知之, 小野貞英, 菅井 有: フローサイトメトリーによる DNA ヒストグラムと免疫染色による増殖細胞核抗原陽性率との比較—その臨床的意義—. 病理と臨床 9: 894-901, 1991.
- 47) 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.
- 48) 前田寛治, 辻 龍雄, 木村由香, 早津良和, 佐々木功典, 篠崎文彦: 口腔扁平上皮癌におけるモノクローナル抗 PCNA 抗体による細胞動態の解析とその意義. 日口外誌 37: 1961-1965, 1991.
- 49) 大坪充寛: 口腔扁平上皮癌における増殖細胞核抗原 (PCNA) による免疫組織化学的研究. 九州歯会誌 49: 108-120, 1995.
- 50) Robbins, B. A., Vega, D. and Ogata, K.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch. Pathol. 111: 841-845, 1987.
- 51) Dawson, A. E., Norton, J. A. and Weinberg, D. S.: Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. Am. J. Pathol. 136: 1115-1124, 1990.
- 52) 藤井昌史, 元井 信, 佐伯英行, 青江啓介, 森脇昭介: 非小細胞肺癌切除例における proliferating cell nuclear antigen の免疫組織化学的検討. 癌の臨床 38: 1190-1194, 1992.