

口腔粘膜悪性リンパ腫における AgNOR 画像解析

山 辺 滋

Image analysis of AgNOR in malignant lymphoma of the oral mucosa

Shigeru YAMABE

Abstract: Silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in malignant lymphoma of the oral mucosa were studied using a computer-assisted system for image analysis. Sixty-two cases of oral lymphoma, including 1 follicular mixed type, 3 follicular large cell types, 8 diffuse medium-sized cell types (DMC), 7 diffuse mixed types, 19 diffuse large cell types (DLC), 16 diffuse pleomorphic types (DPM), and 8 diffuse lymphoblastic & Burkitt types (DLB-DBK), were investigated. AgNOR dots were counted at the light microscope level and 5 morphometric variables (AgNOR clusters, area, perimeter, round-factor, and uneven-factor) were assessed on paraffin sections. The results were compared according to histopathological subtype and immunological phenotype.

The major findings were as follows: 1) Statistically significant differences were found between DMC and DLC, and between DMC and DPM with respect to AgNOR dots, area, and perimeter. 2) A significant difference was found between DMC and DLB-DBK with regard to AgNOR perimeter. 3) A significant difference was found between DLC and DPM with respect to AgNOR uneven-factor. 4) A significant difference was found between B cell lymphoma and T cell lymphoma with regard to AgNOR area.

Key words: silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs), malignant lymphoma of oral mucosa (口腔粘膜悪性リンパ腫), image analysis (画像解析), histopathological classification (病理組織学的分類), immunological phenotype (免疫組織型)

緒 言

口腔粘膜原発の節外性悪性リンパ腫はきわめてまれであり¹⁾、全悪性リンパ腫の0.34%、および節外性悪性リンパ腫の1.4%にすぎない²⁾。したがって、口腔粘膜悪性リンパ腫の病態に関する報告は少なく^{3~5)}、腫瘍の悪性度や細胞増殖能など未だ不明な点が多い。

腫瘍の悪性度を評価するのに、従来より病理組織学的には、核分裂数が、その指標の1つとしてよく用いられてきたが、核分裂数の算出には種々の問題がある

ことも指摘されている⁶⁾。一方、腫瘍の悪性度を判定するのに、近年、細胞の増殖能に関連する蛋白や、細胞周期に関連する抗原を組織化学的または免疫組織化学的に証明する方法が試みられている。細胞増殖能に関連する蛋白として nucleolar organizer regions-associated protein (NOR 関連蛋白)、細胞周期に関連する抗原として proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁷⁾ や Ki-67⁸⁾ などがとくに注目されている。

Nucleolar organizer regions (核小体形成領域 NOR) は acrocentric chromosomes (ヒトの場合、13, 14, 15, 21 および 22 番染色体に存在する) の ribosomal DNA ループに存在し、またその領域は核小体の形成および蛋白合成に深く関与していると考えられている⁹⁾。さらに 1986 年、Ploton ら¹⁰⁾ はこの ribosomal gene の関連蛋白を特異的にしかも簡便に染色

長崎大学歯学部第一口腔外科学教室

(主任：水野明夫教授)

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nagasaki University School of Dentistry (Chief: Prof. Akio Mizuno)

受付日：平成7年9月18日

表 1 口腔粘膜悪性リンパ腫の原発部位

部位	例数	
口蓋	24	(38.8%)
歯肉	18	(29.0%)
舌	9	(14.5%)
頬粘膜	7	(11.3%)
口腔底	3	(4.8%)
口唇	1	(1.6%)
計	62	(100%)

できる one step 鍍銀染色法を開発し、細胞核内に褐色ないし黒色の粒子 (argyrophilic NOR; AgNOR) として、NOR の動態を間接的に観察できることを示した。1 核内の AgNOR の顆粒数は ribosomal DNA の転写活性、つまり、その細胞がもつ蛋白合成能の程度を反映すると考えられており⁹⁾、AgNOR に関する検討は良性および悪性腫瘍の鑑別に、または各種腫瘍の生物学的悪性度の指標として、その有用性が示されている¹¹⁻¹⁹⁾。しかし、口腔粘膜悪性リンパ腫について AgNOR 染色を施行し、その増殖能について検討した報告は見当たらない。さらに AgNOR 染色標本についての検討は目視による AgNOR 顆粒数の算定が主流を占めてきたが、本研究では、口腔粘膜悪性リンパ腫における AgNOR 染色標本について、目視による AgNOR 顆粒数のほかに、画像解析装置を用いて、1 核内の AgNOR の集団数、面積、周長および形状などを求め、日本の Lymphoma Study Group (LSG) 分類による病理組織型、国際分類による組織学的悪性度¹⁴⁾ および免疫組織型との関連を検索し、AgNOR 画像解析の有用性について検討した。

対象および方法

1. 対象

対象は長崎大学歯学部口腔病理学教室 (1982~1994 年)、同大学医学部附属病院病理部 (1962~1994 年) および東北大学医学部附属病院病理部 (1961~1979 年) で診断された口腔原発悪性リンパ腫 62 例であり、これらはいずれも臨床的所見を含め、口腔粘膜原発であることが再確認されたものである⁵⁾。発生部位としては、口蓋および歯肉に多く、全体の約 70% を占めていた (表 1)。また、男性が 71% と優勢であった。年齢分布は、13~86 歳 (平均 54.4 歳) で、50 歳台~70 歳台にピークを認めた (表 2)。

2. 病理組織学的分類

ホルマリン固定パラフィン切片を用いて、hematoxylin eosin (HE)、Periodic acid Schiff (PAS)

表 2 口腔粘膜悪性リンパ腫の年齢分布と性別

	男	女	計
0~9	0	0	0
10~19	3	0	3
20~29	4	1	5
30~39	4	2	6
40~49	7	1	8
50~59	9	4	13
60~69	8	4	12
70~79	8	3	11
80~89	1	3	4
計	44	18	62
平均年齢	51.5	61.4	54.4
男女比 (%)	71	29	

および Giemsa 染色を施し、LSG 分類¹⁴⁾ に準拠し病理組織学的に再検討した。

その結果は、濾胞性混合型 1 例、濾胞性大細胞型 3 例、びまん性中細胞型 8 例、びまん性混合型 7 例、びまん性大細胞型 19 例、多形細胞型 16 例およびリンパ芽球型-バーキット型 8 例であり、びまん性悪性リンパ腫 (58 例) が濾胞性悪性リンパ腫 (4 例) よりもはるかに高頻度であった (表 3)。さらに、これらを国際分類に準じて病理組織学的悪性度分類¹⁴⁾ すると、低悪性度 1 例、中悪性度 37 例および高悪性度 24 例であった。

3. 免疫組織化学的分類

厚さ 3 μ m のパラフィン包埋組織切片に種々のマーカーについて、ABC 法を用いて免疫染色を施した (表 4)。B 細胞性マーカーとして、IgG、IgM、IgA、IgD、kappa、lambda、L26、KiB 3 および LN 1 を、T 細胞性マーカーとして、UCHL 1、MT 1 および DFT 1 を、また組織球性マーカーとして、cathepsin D、KP 1 を使用した。免疫組織学的に腫瘍細胞が、B 細胞性マーカー陽性で T 細胞および組織球性マーカー陰性のものを B 細胞性リンパ腫とし、T 細胞性マーカー陽性で B 細胞および組織球性マーカー陰性のものを T 細胞性リンパ腫とした。また、組織球性リンパ腫と規定したものは組織球性マーカー陽性で B および T 細胞性マーカー陰性である⁵⁾。その結果、B 細胞性リンパ腫 46 例、T 細胞性リンパ腫 10 例および真の組織球性リンパ腫 6 例で、B 細胞性リンパ腫が最も多かった。

4. AgNOR 染色

各症例の切除標本を 10%ホルマリンで約 24 時間固定後、通法にしたがってパラフィンブロックとし、厚さ 3 μ m の薄切片を作製して、AgNOR 染色を施した。AgNOR 染色については、Ploton ら¹⁰⁾ の one step 法

表3 口腔粘膜悪性リンパ腫における病理組織型(LSG分類)と免疫組織的検討

組織型	症例数	免疫学的性状		
		B細胞性	T細胞性	真の組織球性
濾胞性リンパ腫	4	4	0	0
中細胞型	0	0	0	0
混合型	1	1	0	0
大細胞型	3	3	0	0
びまん性リンパ腫	58	42	10	6
小細胞型	0	0	0	0
中細胞型	8	7	0	1
混合型	7	5	1	1
大細胞型	19	16	1	2
多形細胞型	16	7	7	2
リンパ芽球型 -パーキット型	8	7	1	0
計	62	46	10	6

表4 使用した抗体

抗体	タイプ	特異性	希釈倍率	会社名
抗 IgG	ウサギポリクローナル	γ 重鎖	1 : 500	Dako
抗 IgM	ウサギポリクローナル	μ 重鎖	1 : 300	Dako
抗 IgA	ウサギポリクローナル	α 重鎖	1 : 300	Dako
抗 IgD	ウサギポリクローナル	δ 重鎖	1 : 1000	Dako
抗 kappa	ウサギポリクローナル	κ 軽鎖	1 : 1000	Dako
抗 lambda	ウサギポリクローナル	λ 軽鎖	1 : 1000	Dako
抗 cathepsin D	ウサギポリクローナル	組織球	1 : 150	Novocastra
KP 1	マウスモノクローナル	マクロファージ	1 : 100	Dako
L 26	マウスモノクローナル	B細胞	1 : 50	Dako
KiB 3	マウスモノクローナル	B細胞	1 : 5000	Kiel Univ.
LN 1	マウスモノクローナル	胚中心細胞	希釈済	Techniclone
LN 2	マウスモノクローナル	胚中心細胞, 暗殺細胞, 合指状組織球, 組織球, T細胞	希釈済	Techniclone
LN 3	マウスモノクローナル	HLA /DR 発現細胞	希釈済	Techniclone
UCHL 1	マウスモノクローナル	T細胞, 類上皮細胞	1 : 100	Dako
MT 1	マウスモノクローナル	T細胞, 骨髄細胞, マクロファージ	1 : 10	Dako
DFT 1	マウスモノクローナル	T細胞, 骨髄細胞, マクロファージ	1 : 100	Dako
Ber-H2	マウスモノクローナル	ホジキン細胞, RS細胞, 活性化T・B細胞	1 : 20	Dako

の改良法¹⁵⁻¹⁸⁾で行った。すなわち、50%硝酸銀溶液と、1%蟻酸を含む2%ゼラチン溶液を2:1の割合で混合した溶液を反応液として使用した。反応は遮光下、室温で30分間行った。銀粒子を明瞭にするため、銀反応後、0.2%塩化金に10分、定着液に5分浸漬した。

5. AgNOR 計測

1) 目視による AgNOR 計測

Crocker ら¹⁹⁾の方法に用いて、各症例の標本について腫瘍部から腫瘍細胞(核)100個を無作為に選択し、100倍対物レンズを用い、油浸のもとに観察し、目視により1核内の AgNOR の顆粒数を求めた。

2) 画像解析装置による AgNOR 計測

AgNOR 画像解析は, Charpin^ら²⁰⁾の方法に準じて行った。

各種瘍部より 10 視野を無作為に選択し, 100 倍対物レンズを用い, テレビカメラを介して画像解析プロセサー (nexus Qube) に画像入力した。なおモニター画面は 512×480 個の画素 (pixel) で構成され, 1 画素は 0.01040 μ m²で, 最終倍率は 4,000 倍であった。各症例より 120 個~520 個 (平均 274.6 個) の腫瘍細胞 (核) について計測した。コンピュータ画像入力はランダムノイズを除去するため, 同一画面を 5 回入力した後, 平均画像をモニターに残し画像補正を行い, 2 値化により AgNOR 集団のみを取り出した。その後, 直接目視による顕微鏡像と比較し, 画像修正を行った。各 AgNOR 集団の面積, 周長, 最大長, 幅, 丸さ度 $\{(\pi \times \text{最大長}^2) / (4 \times \text{面積})\}$ および凹凸度 $\{ \text{周長}^2 / (4 \pi \times \text{面積}) \}$ を計測した, また, 画像入力された腫瘍細胞 (核) 数は, 手掌用数取器で算定した。

6. 比較分析のための AgNOR 指標

1) 目視による計測

目視によって AgNOR 顆粒数 (1 核内の AgNOR の顆粒数: 顆粒数合計/核数) を計測した。

2) 画像解析装置による計測

画像解析装置を用いて, AgNOR 集団数 (1 核内の AgNOR の集団数: 集団数合計/核数), AgNOR 面積 (1 核内の AgNOR の面積: 面積合計/核数), AgNOR 周長 (1 核内の AgNOR の周長: 周長合計/核数), AgNOR 丸さ度および AgNOR 凹凸度について, それぞれ計測した。なお, AgNOR 丸さ度 (真円のとき 1, 細長い形状のとき高値) および AgNOR 凹凸度 (真円のとき 1, 凸凹な形状のとき高値) に関しては, 1 標本の計測データで AgNOR 集団の面積が大きいものより, 計測細胞 (核) 数の 10% を取り出しその平均値, つまり, 腫瘍細胞 (核) 10 個の中で面積最大の AgNOR 集団を顕微鏡で観察することにより, 日常の診断上, 応用しやすく, しかも再現性の高い方法を用いた。

7. 検定

統計学的な有意差検定は, AgNOR 解析の上記 6 指標について, 多群間の分散分析 Kruskal-Wallis test で有意差が認められたものに, 多重比較検定 Scheffe's test を行った。AgNOR 解析の各 2 指標変量間の相関関係は, Pearson の回帰分析により解析した。すべて危険率 5% 以下をもって有意差ありとみなした。

結 果

1. AgNOR 染色態度と画像解析による 2 値化像について (写真 1~3)

AgNOR 染色標本では, 核内に褐色ないし黒色顆粒

(dot) がみられ, 種々の大きさや形状の集団 (cluster) を形成しているのが観察された。これらの像を画像解析に取り入れた像 (写真 1~3 の A) と, 2 値化された像 (写真 1~3 の B) を比較すると, 以下のように要約される。

1) 濾胞性混合型, びまん性中細胞型およびびまん性混合型 (写真 1)

1 核内の AgNOR の顆粒数は, 2~7 個で, AgNOR 集団は核の比較的中心性に位置し, 類円形を呈していた。

2) 濾胞性大細胞型およびびまん性大細胞型 (写真 2)

1 核内の AgNOR の顆粒数は, 5~15 個で, 比較的面積の広い AgNOR 集団が, 核内に偏在していた。

3) 多形細胞型 (写真 3)

1 核内の AgNOR の顆粒数は, 5~20 個で, 面積が広く, 形状も細長く凹凸度の著しい AgNOR 集団が観察された。

4) リンパ芽球型-バーキット型

1 核内の AgNOR の顆粒数は, 5~12 個で, 比較的面積が広く, いびつな形状の AgNOR 集団が見られた。

2. 病理組織型と各種の AgNOR 指標の関連性 (表 5)

1) 病理組織型と AgNOR 顆粒数について

目視による AgNOR 顆粒数は, 多形細胞型 (6.96±1.70), びまん性大細胞型 (6.75±1.12), 濾胞性大細胞型 (6.53±0.94), リンパ芽球型-バーキット型 (6.21±2.06), びまん性混合型 (4.68±0.47), びまん性中細胞型 (4.21±0.88) そして濾胞性混合型 (3.66) の順に高値を示した。びまん性大細胞型および多形細胞型における AgNOR 顆粒数はびまん性中細胞型よりも統計学的に有意に大であったが (P<0.01), その他の各組織型間に有意差は認められなかった。また, びまん性リンパ腫 (6.13±1.70) は濾胞性リンパ腫 (5.81±1.63) よりも高値であったが有意差は認められなかった。

2) 病理組織型と AgNOR 集団数について

画像解析による AgNOR 集団数は, 多形細胞型 (4.27±2.18), リンパ芽球型-バーキット型 (3.80±1.69), びまん性混合型 (3.06±1.59), 濾胞性大細胞型 (2.71±1.62), びまん性大細胞型 (2.42±0.92), びまん性中細胞型 (2.19±1.04) そして濾胞性混合型 (1.37) の順に高値を示した。各組織型間に有意差は認められなかった。また, びまん性リンパ腫 (3.17±1.73) は濾胞性リンパ腫 (2.38±1.48) よりも高値であったが有意差は認められなかった。

3) 病理組織型と AgNOR 面積について

画像解析による AgNOR 面積は, 多形細胞型 (3.51±1.22), びまん性大細胞型 (3.17±0.80), 濾胞性大細胞型 (2.83±0.26), リンパ芽球型-バーキット型 (2.74±0.63), びまん性混合型 (2.56±0.26), 濾胞性混合型 (1.89) そしてびまん性中細胞型 (1.40±0.11) の順に

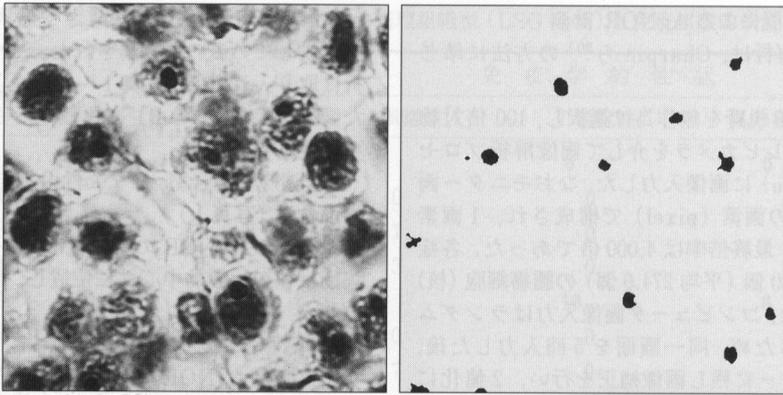


写真1 びまん性中細胞型 (AgNOR 染色, ×4000)
A: 画像解析装置入力像 B: 2 値化像

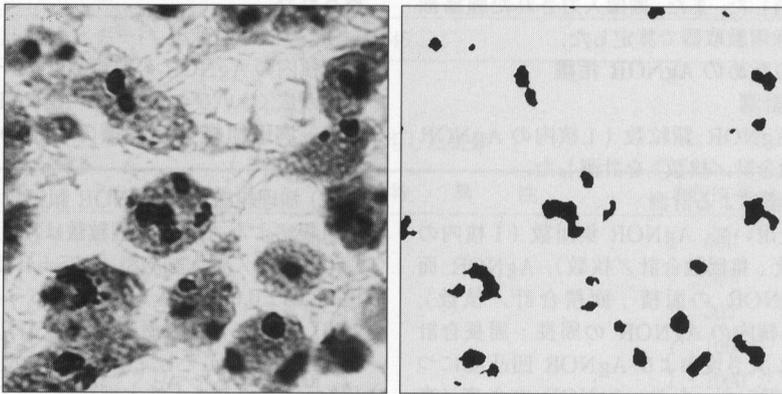


写真2 びまん性大細胞型 (AgNOR 染色, ×4000)
A: 画像解析装置入力像 B: 2 値化像

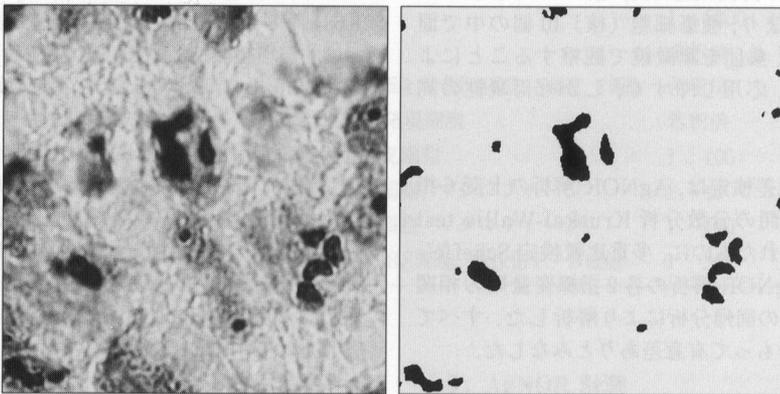


写真3 多形細胞型 (AgNOR 染色, ×4000)
A: 画像解析装置入力像 B: 2 値化像

表5 口腔粘膜悪性リンパ腫の病理組織型における AgNOR 解析

組織型	症例数	目視による計測		画像解析による計測			
		AgNOR 顆粒数	AgNOR 集団数	AgNOR 面積 (μm^2)	AgNOR 周長 (μm)	AgNOR 丸さ度	AgNOR 凹凸度
濾胞性リンパ腫	4	5.81±1.63	2.38±1.48	2.60±0.52	7.21±1.40	2.10±0.24	1.92±0.23
混合型	1	3.66	1.37	1.89	5.21	1.84	1.62
大細胞型	3	6.35±0.94	2.71±1.62	2.83±0.26	7.88±0.50	2.19±0.19	2.02±0.15
びまん性リンパ腫	58	6.13±1.70	3.17±1.73	2.89±1.05	8.78±2.72	2.45±0.43	2.28±0.49
中細胞型	8	4.21±0.88	2.19±1.04	1.40±0.11	4.96±0.85	2.09±0.40	1.88±0.35
混合型	7	4.68±0.47	3.06±1.59	2.56±0.26	8.33±1.21	2.43±0.32	2.06±0.32
大細胞型	19	6.75±1.12	2.42±0.92	3.17±0.80	9.07±2.41	2.35±0.29	2.17±0.39
多形細胞型	16	6.96±1.70	4.27±2.18	3.51±1.22	10.42±2.77	2.80±0.44	2.72±0.49
リンパ芽球型-パーキット型	8	6.21±2.06	3.80±1.69	2.74±0.63	9.02±1.91	2.33±0.41	2.25±0.42

*...P<0.05, ***P<0.01, *****P<0.001

高値を示した。びまん性大細胞型はびまん性中細胞型よりも有意に大であり (P<0.05), 多形細胞型はびまん性中細胞型よりも有意に大であった (P<0.001)。その他の各組織型間に有意差は認められなかった。また、びまん性リンパ腫 (2.89±1.05) は濾胞性リンパ腫 (2.60±0.52) よりも高値であったが有意差は認められなかった。

4) 病理組織型と AgNOR 周長について

画像解析による AgNOR 周長は、多形細胞型 (10.42±2.77)、びまん性大細胞型 (9.07±2.41)、リンパ芽球型-パーキット型 (9.02±1.91)、びまん性混合型 (8.33±1.21)、濾胞性大細胞型 (7.88±0.50)、濾胞性混合型 (5.21)、そして、びまん性中細胞型 (4.96±0.85) の順に高値を示した。びまん性大細胞型はびまん性中細胞型よりも有意に大であり (P<0.01)、多形細胞型は、びまん性中細胞型よりも有意に高値を示し (P<0.001)、さらに、リンパ芽球型-パーキット型はびまん性中細胞型よりも有意に大であった (P<0.05)。その他の各組織型間に有意差は認められなかった。また、びまん性リンパ腫 (8.78±2.72) は濾胞性リンパ腫 (7.21±1.40) よりも高値を示したが有意差は認められなかった。

5) 病理組織型と AgNOR 丸さ度について

画像解析による AgNOR 丸さ度は、多形細胞型 (2.80±0.44)、びまん性混合型 (2.43±0.32)、びまん性大細胞型 (2.35±0.29)、リンパ芽球型-パーキット型 (2.33±0.41)、濾胞性大細胞型 (2.19±0.19)、びまん性中細胞型 (2.09±0.40) そして濾胞性混合型 (1.84) の順に高値を示した。多形細胞型はびまん性中細胞型よりも有意に大であったが (P<0.01)、その他の各組織型間に有意差は認められなかった。また、びまん性

リンパ腫 (2.45±0.43) は濾胞性リンパ腫 (2.10±0.24) よりも高値であったが有意差は認められなかった。

6) 病理組織型と AgNOR 凹凸度について

画像解析による AgNOR 凹凸度は、多形細胞型 (2.72±0.49)、リンパ芽球型-パーキット型 (2.25±0.42)、びまん性大細胞型 (2.17±0.39)、びまん性混合型 (2.06±0.32)、濾胞性大細胞型 (2.02±0.15)、びまん性中細胞型 (1.88±0.35) そして濾胞性混合型 (1.62) の順に高値を示した。多形細胞型はびまん性中細胞型よりも有意に大であり (P<0.01)、さらに、多形細胞型はびまん性大細胞型よりも有意に高値であったが (P<0.05)、その他の各組織型間に有意差は認められなかった。また、びまん性リンパ腫 (2.28±0.49) は濾胞性リンパ腫 (1.92±0.23) よりも高値を示したが有意差は認められなかった。

7) 小括

AgNOR 顆粒数、AgNOR 面積および AgNOR 周長を各組織型について比較すると、多形細胞型・びまん性大細胞型・濾胞性大細胞型>リンパ芽球型-パーキット型>びまん性混合型・濾胞性混合型・びまん性中細胞型の傾向がみられた。しかしながら、AgNOR 集団数についてはこのような傾向はみられなかった。

AgNOR 丸さ度および AgNOR 凹凸度の計測値においては、多形細胞型>リンパ芽球型-パーキット型・びまん性大細胞型>びまん性混合型>びまん性中細胞型>濾胞性大細胞型>濾胞性混合型の傾向が認められた。

6 指標すべてにおいて、びまん性リンパ腫は濾胞性リンパ腫よりも高値であったが有意差は認められなかった。

表6 口腔粘膜悪性リンパ腫の組織学的悪性度における AgNOR 解析

悪性度	症例数	目視による計測			画像解析による計測		
		AgNOR 顆粒数	AgNOR 集団数	AgNOR 面積 (μm^2)	AgNOR 周長 (μm)	AgNOR 丸さ度	AgNOR 凹凸度
低悪性度	1	3.66	1.37	1.89	5.21	1.84	1.62
中悪性度	37	5.79 \pm 1.48	2.52 \pm 1.14	2.65 \pm 0.91	7.94 \pm 2.44	2.30 \pm 0.33	2.07 \pm 0.36
高悪性度	24	6.71 \pm 1.82	4.11 \pm 2.01	3.25 \pm 1.11	9.95 \pm 2.56	2.65 \pm 0.48	2.56 \pm 0.51

*...P<0.05, ***P<0.01, ****P<0.001

表7 口腔粘膜悪性リンパ腫の免疫組織型における AgNOR 解析

免疫組織型	症例数	目視による計測			画像解析による計測		
		AgNOR 顆粒数	AgNOR 集団数	AgNOR 面積 (μm^2)	AgNOR 周長 (μm)	AgNOR 丸さ度	AgNOR 凹凸度
B細胞性リンパ腫	46	5.98 \pm 1.73	2.98 \pm 1.53	2.69 \pm 0.93	8.34 \pm 2.65	2.37 \pm 0.42	2.20 \pm 0.47
T細胞性リンパ腫	10	6.75 \pm 1.52	3.06 \pm 1.84	3.68 \pm 1.06	10.09 \pm 1.94	2.58 \pm 0.44	2.43 \pm 0.45
真の組織球性リンパ腫	6	6.09 \pm 1.57	4.26 \pm 2.63	2.87 \pm 1.20	8.93 \pm 3.52	2.61 \pm 0.46	2.39 \pm 0.70

*...P<0.05

3. 病理組織学的悪性度と各 AgNOR 指標との関連性 (表6)

1) 組織学的悪性度と AgNOR 顆粒数について

目視による AgNOR 顆粒数は、高悪性度群 (6.71 \pm 1.82)、中悪性度群 (5.79 \pm 1.48) そして低悪性度群 (3.66) の順に高値を示したが各悪性度群間に有意差は認められなかった。

2) 組織学的悪性度と AgNOR 集団数について

画像解析による AgNOR 集団数は、高悪性度群 (4.11 \pm 2.01)、中悪性度群 (2.52 \pm 1.14) そして低悪性度群 (1.37) の順に高値を示した。高悪性度群は中悪性度群よりも統計学的に有意に大であった (P<0.001)。その他の各悪性度群の間に有意差は認められなかった。

3) 組織学的悪性度と AgNOR 面積について

画像解析による AgNOR 面積は、高悪性度群 (3.25 \pm 1.11)、中悪性度群 (2.65 \pm 0.91) そして低悪性度群 (1.89) の順に高値を示したが、各悪性度群の間に有意差は認められなかった。

4) 組織学的悪性度と AgNOR 周長について

画像解析による AgNOR 周長は、高悪性度群 (9.95 \pm 2.56)、中悪性度群 (7.94 \pm 2.44) そして低悪性度群 (5.21) の順に高値を示した。高悪性度群は中悪性度群よりも統計学的に有意に大であったが (P<0.05)、その他の各悪性度群の間に有意差は認められなかった。

5) 組織学的悪性度と AgNOR 丸さ度について

画像解析による AgNOR 丸さ度は、高悪性度群

(2.65 \pm 0.48)、中悪性度群 (2.30 \pm 0.36) そして低悪性度群 (1.84) の順に高値を示した。高悪性度群は中悪性度群よりも統計学的に有意に大であった (P<0.01)。その他の各悪性度群の間に有意差は認められなかった。

6) 組織学的悪性度と AgNOR 凹凸度について

画像解析による AgNOR 凹凸度は、高悪性度群 (2.56 \pm 0.51)、中悪性度群 (2.07 \pm 0.36) そして低悪性度群 (1.62) の順に高値を示した。高悪性度群は中悪性度群よりも統計学的に有意に大であったが (P<0.001)、その他の各悪性度群の間に有意差は認められなかった。

7) 小括

目視および画像解析による計測値は6指標すべてにおいて、高悪性度群>中悪性度群>低悪性度群であった。AgNOR 集団数、AgNOR 周長、AgNOR 丸さ度および AgNOR 凹凸度においては、高悪性度群は中悪性度群よりも統計学的に有意差が認められた。AgNOR 顆粒数および AgNOR 面積においては、各悪性度群の間に有意差は認められなかった。

4. 免疫組織型と各種 AgNOR 指標との関連性 (表7)

1) 免疫組織型と AgNOR 顆粒数について

目視による AgNOR 顆粒数は、T細胞性リンパ腫 (6.75 \pm 1.52)、真の組織球性リンパ腫 (6.09 \pm 1.57) そして B細胞性リンパ腫 (5.98 \pm 1.73) の順に高値を示した

表 8 口腔粘膜悪性リンパ腫における各 AgNOR 指標間の相関関係 (ピアソンの相関係数)

	AgNOR 顆粒数	AgNOR 集団数	AgNOR 面積	AgNOR 周長	AgNOR 丸さ度
AgNOR 集団数	0.08 ^{N.S.}				
AgNOR 面積	0.67**	0.35**			
AgNOR 周長	0.62**	0.56**	0.91**		
AgNOR 丸さ度	0.26*	0.34**	0.32**	0.53**	
AgNOR 凹凸度	0.44**	0.06 ^{N.S.}	0.43**	0.55**	0.83**

*...P<0.05, **...P<0.001

が、各免疫組織型の間には有意差は認められなかった。

2) 免疫組織型と AgNOR 集団数について

画像解析による AgNOR 集団数は、真の組織球性リンパ腫 (4.26±2.63), T 細胞性リンパ腫 (3.06±1.84) そして B 細胞性リンパ腫 (2.98±1.53) の順に高値を示したが、各免疫組織型の間には有意差は認められなかった。

3) 免疫組織型と AgNOR 面積について

画像解析による AgNOR 面積は、T 細胞性リンパ腫 (3.68±1.06), 真の組織球性リンパ腫 (2.87±1.20) そして B 細胞性リンパ腫 (2.69±0.93) の順に高値を示した。T 細胞性リンパ腫は B 細胞性リンパ腫よりも統計学的に有意に大であったが (P<0.05), その他の各免疫組織型の間には有意差は認められなかった。

4) 免疫組織型と AgNOR 周長について

画像解析による AgNOR 周長は、T 細胞性リンパ腫 (10.09±1.94), 真の組織球性リンパ腫 (8.93±3.52) そして B 細胞性リンパ腫 (8.34±2.65) の順に高値を示したが、各免疫組織型の間には有意差は認められなかった。

5) 免疫組織型と AgNOR 丸さ度について

画像解析による AgNOR 丸さ度は、真の組織球性リンパ腫 (2.61±0.46), T 細胞性リンパ腫 (2.58±0.44), そして B 細胞性リンパ腫 (2.37±0.42) の順に高値を示したが、各免疫組織型の間には有意差は認められなかった。

6) 免疫組織型と AgNOR 凹凸度について

画像解析による AgNOR 凹凸度は、T 細胞性リンパ腫 (2.43±0.45), 真の組織球性リンパ腫 (2.39±0.70) そして B 細胞性リンパ腫 (2.20±0.47) の順に高値を示したが、各免疫組織型の間には有意差は認められなかった。

7) 小括

すべての AgNOR 6 指標において、T 細胞性リンパ腫>B 細胞性リンパ腫の関係が成立し、とくに AgNOR 面積に関してのみ、T 細胞性リンパ腫 (3.68±0.34) が B 細胞性リンパ腫 (2.69±0.14) よりも統計学的に有意に大であった (P<0.05)。さらに、AgNOR 顆粒数, AgNOR 面積, AgNOR 周長, および AgNOR 凹凸度については、T 細胞性リンパ腫>真の組織球性リンパ腫>B 細胞性リンパ腫の関係もみられた。

5. 各 AgNOR 指標間の相関関係 (表 8)

AgNOR 面積と AgNOR 周長の間には、相関係数 $r=0.91$ ときわめて強い相関関係が、また、AgNOR 丸さ度と AgNOR 凹凸度の間にも、 $r=0.83$ と強い相関関係が認められた (P<0.001)。

さらに、AgNOR 顆粒数と AgNOR 面積 ($r=0.67$), AgNOR 顆粒数と AgNOR 周長 ($r=0.62$), AgNOR 集団数と AgNOR 周長 ($r=0.56$), AgNOR 周長と AgNOR 凹凸度 ($r=0.55$), AgNOR 周長と AgNOR 丸さ度 ($r=0.53$), AgNOR 顆粒数と AgNOR 凹凸度 ($r=0.44$), および AgNOR 面積と AgNOR 凹凸度 ($r=0.43$) のそれぞれの間には相関が認められた (P<0.001)。

一方、AgNOR 集団数と AgNOR 面積 ($r=0.35$), AgNOR 集団数と AgNOR 丸さ度 ($r=0.34$) および AgNOR 面積と AgNOR 丸さ度 ($r=0.32$) の相関関係は弱く (P<0.001), また、AgNOR 顆粒数と AgNOR 丸さ度 ($r=0.26$) についても同様の傾向がうかがわれた (P<0.05)。

考 察

AgNOR の腫瘍病理学への応用の目的は、AgNOR 染色標本で 1 核内の AgNOR の顆粒数を目視で算定することにより、過形成と腫瘍、また、良性腫瘍と悪性腫瘍とを鑑別する点にあった。従来の悪性リンパ腫に関する AgNOR の報告はこの手技・側面からのものが主流を占めていた^{11, 17, 18, 22}。

そこで、本研究では、口腔粘膜悪性リンパ腫の AgNOR 染色標本像を画像解析装置に取り入れ、目視では計測されなかった各種 AgNOR 指標 (集団数, 面積, 周長, 丸さ度および凹凸度) の詳細な検討を行った。

1. 病理組織型, 病理組織学的悪性度と各種 AgNOR 指標との関連性について

Crocker らの算定方法を用いた著者の AgNOR 顆粒数の計測結果では、各組織型間で値の相違がみられ、びまん性大細胞型および多形細胞型は、びまん性中細

胞型よりも統計学的に AgNOR 顆粒数が有意に高値を示した。

さらに、大型の腫瘍細胞（核）からなる 3 組織型、すなわち、びまん性大細胞型、多形細胞型および濾胞性大細胞型は、他の組織型に比べて、AgNOR 顆粒数は高値を示した。しかも、これら 3 組織型に比べ悪性度が高いが比較的小型の腫瘍細胞（核）で構成されるリンパ芽球型-パーキット型よりも、AgNOR 顆粒数は、さらに高値であった。このことから、AgNOR 顆粒数は腫瘍細胞（核）の大きさと関連するものとみなされた。リンパ芽球型-パーキット型は、濾胞性中細胞型やびまん性中細胞型よりも高値、また、多形細胞型は、濾胞性大細胞型やびまん性大細胞型よりも高値であった。すなわち、腫瘍細胞（核）の大きさがほぼ同程度の場合、各病理組織型の悪性度と AgNOR 顆粒数との関連性が想定された。しかし、AgNOR 顆粒数は、濾胞性混合型とびまん性混合型、また、濾胞性大細胞型とびまん性大細胞型では、それぞれ近似しており、腫瘍細胞の増殖様式を反映するものではなかった。

AgNOR 面積および AgNOR 周長においても、AgNOR 顆粒数と同様に、びまん性大細胞型と多形細胞型は、びまん性中細胞型よりも有意に高値であった。さらに、各組織型におけるこれらの測定値も、AgNOR 顆粒数とほぼ同様、腫瘍の悪性度との関連性がうかがわれた。すなわち、AgNOR 面積および AgNOR 周長も、各組織型の悪性度のみでなく、腫瘍細胞（核）の大きさとも関連するものと考えられた。なお、AgNOR 周長は、びまん性大細胞型および多形細胞型が、びまん性中細胞型より有意に高値であっただけでなく、リンパ芽球型-パーキット型がびまん性中細胞型より有意に大であることが特筆すべき点であった。リンパ芽球型-パーキット型は、腫瘍細胞（核）の大きさがびまん性中細胞型とほぼ等大であることから、しばしば、びまん性中細胞型との組織学的鑑別が困難な症例に遭遇する。したがって、AgNOR 周長は、これらの鑑別にきわめて有力な指標とみなされた。

一方、形状係数（AgNOR 丸さ度、AgNOR 凹凸度）においては、びまん性混合型が濾胞性混合型よりも高値、また、びまん性大細胞型が濾胞性大細胞型よりも高値を示し、腫瘍細胞の増殖様式による悪性度を反映している可能性が示唆された。また、リンパ芽球型-パーキット型は、それよりも明らかに腫瘍細胞（核）が大きい濾胞性大細胞型やびまん性大細胞型よりも高値であるか、近似した値を示し、形状係数（AgNOR 丸さ度、AgNOR 凹凸度）は、腫瘍細胞の大小にかかわらず、腫瘍細胞の悪性度を示す指標とみなされた。濾胞性混合型からリンパ芽球型-パーキット型に向かって順に悪性度が増すと考えられるが（表 5）、AgNOR 丸さ度および AgNOR 凹凸度はほぼこれを裏付ける値を示したといえる。なお、多形細胞型はびまん性大細

胞型よりも、AgNOR 凹凸度が統計学的に有意に大であったことは、鑑別がしばしば困難な両組織型の診断基準の 1 つとして、きわめて有用とみなされた。

今回、計測した AgNOR 指標の中で、AgNOR 集団数は各組織型間で有意差を認めず、口腔粘膜悪性リンパ腫の病理組織学的な鑑別の指標として適切とはいえなかった。

すべての AgNOR 指標の計測値において、高悪性度群 > 中悪性度群 > 低悪性度群であり、AgNOR 集団数、AgNOR 周長、AgNOR 丸さ度および AgNOR 凹凸度においては有意差が認められた。すなわち、各種 AgNOR 指標と病理組織学的悪性度との関連が強く示唆された。

2. 免疫組織型と AgNOR 指標との関連性について

AgNOR のすべての指標において T 細胞性リンパ腫 > B 細胞性リンパ腫であったが、とくに AgNOR 面積にて統計学的有意差を認めた。下山ら²³⁾ は、本邦のリンパ節原発悪性リンパ腫において、B 細胞性リンパ腫よりも T 細胞性リンパ腫が予後が不良と報告しているが、自験の AgNOR 各指標の測定結果も、これを支持するものであった。

3. 各 AgNOR 指標間の相関関係について

本研究では、AgNOR 染色標本を用いて、目視による AgNOR 顆粒数の他に、画像解析装置による AgNOR 顆粒数、AgNOR 面積、AgNOR 周長、AgNOR 丸さ度および AgNOR 凹凸度を指標とした。その結果、AgNOR 面積と AgNOR 周長 ($r=0.91$) また、AgNOR 丸さ度と AgNOR 凹凸度 ($r=0.83$) のそれぞれの間に、強い相関が認められた。

AgNOR 顆粒数と AgNOR 面積との関係については、AgNOR 顆粒数が大きくなるにしたがって AgNOR 面積は小さくなるという報告^{24, 25)} と、AgNOR 顆粒数が大きくなるにしたがって AgNOR 面積も大きくなるという相反する報告^{26, 27)} がある。本研究においては、口腔粘膜悪性リンパ腫の場合、AgNOR 顆粒数と AgNOR 面積 ($r=0.67$, $P<0.001$) は正の相関を認め、後者の説を支持するものであった。

その他の AgNOR 指標間には、少なくとも強い相関関係を認めえなかった。とくに、AgNOR 顆粒数と AgNOR 集団数において相関が認めえなかったことは、目視による AgNOR 顆粒数の計測と、画像解析装置を用いての AgNOR 集団数の計測とは、細胞生物学的にみて別の意義をもつものと考えられた。

4. 目視および画像解析による AgNOR 計測の意義

各種 AgNOR 指標を計測したが、目視による顕微鏡の焦点深度を変えながらの AgNOR 顆粒数の計測方法は、AgNOR 顆粒の大きさはほぼ一定しているので²⁸⁾、AgNOR の量を計測するのに適している。

AgNOR 顆粒数と組織学的悪性度の関連性についての報告^{11-13, 15-22)}は少なくないが、当初の報告とは異なって、AgNOR 顆粒数と組織学的悪性度とは比較的関連性が薄いとする報告がみられる^{29, 30)}。しかしながら、口腔粘膜悪性リンパ腫に関する本研究において、従来から行われている目視による AgNOR 顆粒数では、びまん性中細胞型はびまん性大細胞型や多形細胞型との間に有意差を認め(表5)、腫瘍細胞の AgNOR 顆粒数と組織学的悪性度の関連性を裏付けるものであった。

これまで、各種腫瘍に対する AgNOR を応用した病理学的研究においては、AgNOR の形状係数(AgNOR 丸さ度、AgNOR 凹凸度)の有用性について検討された報告は見当たらない。このたびの口腔粘膜悪性リンパ腫についての自験の結果で、これらが有効な指標として認められたことは、きわめて意義ある知見といえる。今回、日常診断に実用可能とするため、AgNOR 丸さ度と AgNOR 凹凸度は AgNOR 集団の面積が大きなものから 10%の腫瘍細胞(核)数を選択した。つまり、実際に顕微鏡で目視する際、任意の腫瘍細胞(核)10個のうちで、最大の AgNOR 集団に注目すればよいことになる。さらに顕微鏡の高倍率化および画像解析装置の精度向上を図ることで、形状係数の有用性がさらに発揮されると思われる。

本研究での特筆すべき点は、画像解析装置による AgNOR 周長では、びまん性中細胞型とリンパ芽球型-パーキット型の間に有意差を認め、AgNOR 凹凸度では、多形細胞型とリンパ芽球型-パーキット型の間に有意差を確認したことである。

以上のことから、腫瘍細胞増殖性の評価として、1核内の AgNOR の量(AgNOR 顆粒数、AgNOR 面積)および AgNOR の形状(AgNOR 丸さ度、AgNOR 凹凸度)が重要であり、これらの AgNOR 指標はとくに口腔粘膜悪性リンパ腫の細胞増殖能および生物学的特徴を評価する上で、きわめて有用であることが示唆された。

結 語

AgNOR 染色を施した口腔粘膜悪性リンパ腫 62 例について、目視および画像解析装置を用いて各種 AgNOR 指標を計測し、病理組織型および免疫組織型と各種 AgNOR 指標の関連性について比較検討した。

1. AgNOR 顆粒数、AgNOR 面積、および AgNOR 周長の値は、びまん性大細胞型および多形細胞型では、びまん性中細胞型より統計学的に有意に大であった。

2. AgNOR 周長は、リンパ芽球型-パーキット型では、びまん性中細胞型より有意に大であり、AgNOR 凹凸度は、多形細胞型では、びまん性大細胞型より有意に大であった。それぞれ組織学的鑑別が問題となる

両者に、診断の一助として有用とみなされた。

3. すべての AgNOR 指標の計測値には、高悪性度>中悪性度>低悪性度の傾向がみられ、AgNOR 集団数、AgNOR 周長、AgNOR 丸さ度および AgNOR 凹凸度においては有意差が認められた。各種 AgNOR 指標と病理組織学的悪性度との関連が強く示唆された。

4. すべての AgNOR 指標の値は、T 細胞性リンパ腫では B 細胞性リンパ腫より大であり、AgNOR 面積には有意差を認めた。このことから、T 細胞性リンパ腫の細胞増殖性の高いことを裏付けた。

稿を終えるに当たり、御懇篤な御指導と御校閲を賜った長崎大学歯学部第一口腔外科学教室水野明夫教授、ならびに同口腔病理学教室岡邊治男教授に深甚の感謝を捧げます。また、終始御懇切な御教示を賜った同口腔病理学教室高橋 弘助教授に衷心より感謝を捧げるとともに、口腔病理学教室および当教室員各位の御理解と御協力に謝意を表します。なお、研究遂行に際し、画像解析、その他について御指導を賜った本学医学部附属原爆被災学術資料センター病理部岸川正大助教授に深謝致します。

本論文の要旨は、1995年10月19日第40回日本口腔外科学会総会(東京)において発表した。

引用文献

- 1) Gall, E.A., Mallory, T.B., et al.: Malignant lymphoma. A clinico-pathologic survey of 618 cases. *Am. J Pathol* 18: 381-415 1942.
- 2) Freeman, C., Berg, J.W., et al.: Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer* 29: 252-260 1972.
- 3) Handlers, J.P., Howell, R.E., et al.: Extranodal oral lymphoma. Part I. A morphologic and immunoperoxidase study of 34 cases. *Oral Surg* 61: 362-367 1986.
- 4) Howell, R.E., Handlers, J.P., et al.: Extranodal oral lymphoma. Part II. Relationships between clinical features and the Lukes-Collins classification of 34 cases. *Oral Surg* 64: 597-602 1987.
- 5) Takahashi, H., Fujita, S., et al.: Immunophenotypic analysis of extranodal non-Hodgkin's lymphomas in the oral cavity. *Path Res Pract* 189: 300-311 1993.
- 6) Baak, J.P.A.: Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol* 21: 683-685 1990.
- 7) Bravo, R., Frank, R., et al.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase - δ . *Nature* 326: 515-517 1987.
- 8) Ito, M., Tsurusawa, M., et al.: Cell proliferation in childhood acute leukemia. Comparison of Ki-67 and proliferating

- cell nuclear antigen. Immunocytochemical and DNA flow cytometric analysis. *Cancer* 69: 2176-2182 1992.
- 9) Lewin, B.: Gene Expression. Eukaryotic Chromosomes vol. 2. 2nd Ed, John Wiley and Sons, New York, 1980, p875-878.
 - 10) Ploton, D., Menager, M., et al.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 18: 5-14 1986.
 - 11) Crocker, J. and Nar, P.: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 151: 111-118 1987.
 - 12) Trerè, D., Farabegoli, F., et al.: AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyurine labelling and Ki-67 immunostaining. *J Pathol* 165: 53-59 1991.
 - 13) Rüschoff, J., Plate, K., et al.: Nucleolar organizer regions (NORs). Basic concepts and practical application in tumor pathology. *Path Res Pract* 185: 878-885 1989.
 - 14) 小島 瑞, 飯島宗一, 他編: 新分類による悪性リンパ腫アトラス. 第1版, 文光堂, 東京, 1981, 27-50頁.
 - 15) Fujita, S., Takahashi, H., et al.: Nucleolar organizer regions in malignant salivary gland tumors. *Acta Pathologica Japonica* 42: 727-733 1992.
 - 16) Fujita, S., Takahashi, H., et al.: Proliferative activity in normal salivary gland and pleomorphic adenoma. *Acta Pathologica Japonica* 42: 573-578 1992.
 - 17) Takahashi, H., Fujita, S., et al.: Estimation of silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in lymphoproliferative disorders of gastrointestinal tract. *Path Res Pract* 190: 350-361 1994.
 - 18) Takahashi, H., Fujita, S., et al.: Nucleolar organizer regions (NORs) in lymphoproliferative disorders of the human salivary gland. *Anal Cell Pathol* 6: 51-63 1994.
 - 19) Crocker, J., Boldy, D.A.R., et al.: How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 158: 185-188 1989.
 - 20) Charpin, C., Bonnier, P., et al.: Correlation of nucleolar organizer regions and nuclear morphometry assessed by automatic image analysis in breast cancer with aneuploidy, Ki67 immunostaining, histopathologic grade and lymph node involvement. *Path Res Pract* 188: 1009-1017 1992.
 - 21) Mikou, P., Kanavaros, P., et al.: Nucleolar organizer regions (NORs) staining and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) gastric lymphomas. *Path Res Pract* 189: 1004-1009 1993.
 - 22) Jakic-Razumovic, J., Labar, B., et al.: The nucleolar organizer regions in malignant non-Hodgkin's lymphoma. *Lijec Vjesn* 144: 18-21 1992.
 - 23) 下山正徳, 湊 啓輔, 他: 非ホジキンリンパ腫の臨床研究(3) T・Bリンパ腫の臨床診断, 病理診断および臨床病期と予後. *臨床血液* 26: 1419-1429 1984.
 - 24) Rüschoff, J., Bittinger, A., et al.: Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. *Path Res Pract* 186: 85-91 1990.
 - 25) Derenzini, M., Romagnoli, T., et al.: Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumor of human intestine. *Virchows Arch B cell Pathol* 54: 334-340 1988.
 - 26) Derenzini, M., Nardi, F., et al.: Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytologica* 33: 491-498 1989.
 - 27) Trerè, D., Pession, A., et al.: The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* 184: 131-137 1989.
 - 28) Hufnagl, P., Guski, H., et al.: Measuring of AgNORs using image analysis. *Zentralbl Pathol* 140: 31-35 1994.
 - 29) Griffiths, A.P., Butler, C.W. et al.: Silver-stained structures (AgNORs), their dependence of tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. *J Pathol* 159: 121-127 1989.
 - 30) Howat, A.J., Giri, D.D., et al.: Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. *J Pathol* 156: 227-232 1988.