

---

學位請求論文

---

---

林 勝彦

---

①

エナメル上皮腫，悪性エナメル上皮腫における細胞増殖能と  
癌遺伝子産物，癌抑制遺伝子産物発現の相関

林 勝彦

Oncogene and Tumor Suppressor Gene Products in Ameloblastoma  
and Malignant Ameloblastoma : Correlation with Cell Kinetics

Katsuhiko HAYASHI

岡山大学大学院歯学研究科 歯学専攻

研究分野：口腔病理学

主任指導：岡山大学歯学部口腔病理学講座 永井教之教授

## 目 次

I. 緒言	2
II. 材料および方法	4
1. 検索材料	4
2. 組織学的研究方法	5
III. 結果	6
1. 抗 PCNA 抗体による細胞増殖能の検討	6
2. 癌遺伝子産物の発現	9
3. p53 癌抑制遺伝子産物の発現	10
4. 各種遺伝子産物の発現と PCNA 陽性率の関連性	10
IV. 考察	14
1. エナメル上皮腫の細胞増殖能	14
2. エナメル上皮腫における癌遺伝子産物の発現	15
3. エナメル上皮腫における p53 癌抑制遺伝子産物の発現	17
4. エナメル上皮腫の潜在的悪性能	18
V. 結論	20
VI. 謝辞	21
VII. 引用文献	22
VIII. 写真説明	

## I. 緒 言

一般にエナメル上皮腫は、緩慢な膨張性発育を示す良性腫瘍とされている。しかし、局所浸潤性の増殖、再発を示す症例も少なくなく、稀に悪性転化や転移をきたすことから、悪性腫瘍に準じた取り扱いがなされることの多い腫瘍である。本腫瘍に関して、臨床的、病理組織学的に様々な報告がなされているが、その生物学的性格は不明な点が多く、その潜在的悪性能を支持する報告もみられる<sup>1,2)</sup>。

近年、腫瘍細胞の増殖能からその細胞動態を解明する試みが多く行われている。細胞動態の検索に用いられる増殖細胞関連抗原には、増殖細胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen), Ki-67 抗原<sup>3)</sup>, BrdU 反応抗原<sup>4)</sup>があげられる。それらの中で、免疫組織化学的染色により容易に検索可能な PCNA は、Miyachi ら<sup>5)</sup>により全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の血清中から検出された蛋白質で、増殖細胞核と特異的に反応する血中自己抗体に対する対応抗原である。また、本蛋白質は DNA polymerase  $\delta$  コア酵素の活性促進に必要とされる補助因子であり<sup>6,7)</sup>、細胞周期の G<sub>0</sub> 期ではほとんど認められないが、G<sub>1</sub> 後期から S 期にかけて核内に出現し、S 期以降は消失することが報告されている<sup>8)</sup>。これらのことから、PCNA は DNA 合成、あるいは細胞増殖に深く関与していると考えられている。本蛋白質の免疫組織化学的検索が、さまざまな腫瘍組織に関してなされており、細胞増殖能の指標、あるいは腫瘍組織の悪性度、侵襲度の指標としての有用性が指摘されている<sup>9-12)</sup>。

一方、ここ十数年来、発癌の機構が分子レベルで明らかとなり、その原因が遺伝子の異常にあることが解明されつつある。現在までに数十種類もの癌遺伝子や癌抑制遺伝子がクローニングされ、様々な腫瘍組織における多種多様な変化が見い出されている<sup>13-18)</sup>。さらに、これらの分子生物学的研究と平行して、癌遺伝子産物や癌抑制遺伝子産物に対する抗体が精製され、産物の生理的機能の研究のみならず、腫瘍診断への応用が試みられている。癌遺伝子産物はその生理的機能から 1) 転写制御因子群、2) GTP 結合蛋白質群、3) セリン・スレオニンキナーゼ群、4) 非受容体型チロシンキナーゼ群、5) 受容体型チロシンキナーゼ群、6) 増殖因子群に大別され、いずれも細胞における一連のシグナル伝達系において重要な役割を担っている

といわれている。転写制御因子群のひとつである *c-myc* 蛋白質をコードする *myc* 遺伝子は、ニワトリ白血病ウイルスが持つ発癌遺伝子 *v-myc* 遺伝子と相同性をもつ細胞遺伝子として発見された<sup>19)</sup>。その産生蛋白質は、62kD の DNA 結合蛋白質であり<sup>20)</sup>、細胞の G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期より S 期への移行を促進する転写促進因子であると考えられている<sup>21)</sup>。*H-ras*、*K-ras* 遺伝子は、それぞれラットの Harvey 肉腫ウイルス、Kirsten 肉腫ウイルスのもつ発癌遺伝子と相同性を持つ細胞遺伝子として発見された癌遺伝子である<sup>22)</sup>。さらに *N-ras* が酷似する遺伝子として見い出されている<sup>22)</sup>。その産生蛋白質は分子量 21kD の GTP 結合蛋白質であり<sup>23)</sup>、細胞の増殖、分化のシグナル伝達において、シグナルの開閉を制御する分子スイッチとして重要な役割を果たしている<sup>24)</sup>。*c-erbB-2* 遺伝子は、トリ赤芽球症ウイルス *v-erbB* に類似する細胞遺伝子として Semba ら<sup>25)</sup>によって見い出され、その産生蛋白質は EGF 受容体に酷似した構造を示し、チロシンキナーゼ活性を有する 185kD の細胞膜貫通型糖蛋白質である<sup>26)</sup>。しかし、その生理的機能は明らかでなく、特異的なリガンドとして heregulin ファミリーが報告されているが<sup>27)</sup>、いまだ確定されていない。代表的な癌抑制遺伝子である *p53* 遺伝子は 17 染色体短腕に存在し、その遺伝子変異はヒトの悪性腫瘍において高頻度に認められ、*p53* 遺伝子のアレルの欠失と点突然変異が腫瘍の発生や増殖に深く関与すると報告されている<sup>18, 28, 29)</sup>。*p53* 遺伝子、およびその産物の生理的機能は明確には解明されていないが、野生型 *p53* 蛋白質は細胞周期を制御、調節していると考えられている<sup>30)</sup>。また、なんらかの原因により DNA に損傷を受けたときに細胞周期を G<sub>1</sub> 期で停止させることが *p53* 蛋白質の生理的な役割であるとの報告もみられる<sup>31)</sup>。

近年、これらの癌関連遺伝子産物に関する免疫組織化学的研究が多く為されており、腫瘍の悪性度あるいは転移性などの生物学的性状が、癌遺伝子産物、癌抑制遺伝子産物の陽性細胞率、染色性の差異として示されるとの報告が見られる<sup>32-36)</sup> が、歯原性腫瘍に関しては、*ras* 蛋白質の免疫組織化学的検索が Sandros ら<sup>37)</sup>により報告されているのみであり、その詳細な検討は為されていない。しかしながら、エナメル上皮腫、悪性エナメル上皮腫において、これらの遺伝子産物の関与があるのか、

あるとすればどのような役割を担っているのか、あるいは細胞学的悪性能の指標として有用であるのかといった問題は興味深いと思われる。

本研究では、抗 PCNA モノクローナル抗体を用いてエナメル上皮腫、エナメル上皮腫再発例、および悪性エナメル上皮腫に関して免疫組織化学的検索を行い、腫瘍組織の細胞増殖能、細胞動態について検討した。さらに、癌遺伝子産物のうち、転写制御因子群、GTP 結合蛋白質群、受容体型チロシンキナーゼ群からそれぞれ c-myc, ras, c-erbB-1, 2, 3 蛋白質を選び、p53 癌抑制遺伝子産物を含めた 6 種類の遺伝子産物に関して、その局在を免疫組織化学的に検索し、PCNA の陽性率とその局在分布様式との比較検討を試みた。

## Ⅱ. 材料および方法

### 1. 検索材料

本研究で使用した症例は、表 1 に示すように 1987 年から 1992 年までの間に岡山大学歯学部附属病院において得られたエナメル上皮腫 16 例、エナメル上皮腫再発例 6 例、および悪性エナメル上皮腫 2 例であり、すべて生検材料を検索材料とした。エナメル上皮腫の組織型は WHO の歯原性腫瘍分類<sup>38)</sup>に基づいた濾胞型 8 例、叢状型 8 例である。エナメル上皮腫再発例は初発時から最終再発時まで経過観察可能であった 4 例（濾胞型 3 例、濾胞型と叢状型の混在型 1 例）と、再発症例のみ検索し得た 2 例（濾胞型 1 例、混在型 1 例）の計 6 例である。また、悪性エナメル上皮腫は 2 例ともに再発を繰り返した症例であるが、初発時生検材料を検索材料とした。また対照として、成人正常歯肉上皮 5 例、岡山大学医学部第 1 病理学講座より供与を受けた胎生 16-20 週齢の自然流産胎児より得られた歯槽粘膜上皮 3 例および乳歯胚 3 例を検索した。

表1 検索材料

エナメル上皮腫	
濾胞型	8例
叢状型	8例
エナメル上皮腫再発例	6例
悪性エナメル上皮腫	2例
成人正常歯肉上皮	5例
胎児歯槽粘膜上皮 (胎性16~20週齡)	3例
胎児乳歯胚 (胎性16~20週齡)	3例

## 2. 組織学的研究方法

光学顕微鏡用標本作製方法：組織はすべて10%中性緩衝ホルマリン浸漬固定後、常法に従いアルコール系列で脱水、パラフィン包埋した。厚さ約3 $\mu$ mのパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡的に観察した。

免疫組織化学的染色方法：免疫組織化学的染色に用いた一次抗体(表2)はいずれもモノクローナル抗体であり、細胞増殖能の指標として抗PCNA抗体、癌遺伝子産物に対する抗体として抗c-myc, 抗ras, 抗c-erbB-1, 抗c-erbB-2, 抗c-erbB-3抗体、癌抑制遺伝子産物に対する抗体として抗p53抗体を使用した。切片を脱パラフィン後、0.03%過酸化水素メタノール溶液に30分浸漬し、以下に述べるように、ABC Kit (Vecta)を用いて、アビジン-ビオチン複合法により行った。75倍希釈ウマ正常血清で20分反応後、一次抗体を4 $^{\circ}$ C, 16時間反応させた。次いで200倍希釈2次抗体30分反応後、55倍希釈アビジン-ビオチン複合体を30分室温で反応させた。希釈はすべて、0.005M トリス-塩酸緩衝生理食塩液で行なった。発色基質は、0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加0.02% 3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩(0.05M トリス-塩酸緩衝液pH 7.6)を用いた。発色後、メチルグリーンにより対比染色を行ない光顕的に観察した。なお、一次抗体を反応させず、その他の処理を同様に行い陰性コントロールとした。また、p53免疫染色に際しての陽性コントロールとして、Exon8, コドン273において点突然変異を認め、蛋白質レベルでの過剰発現を示した扁平上皮癌症例を用いた。

各蛋白質の陽性細胞の基準は、PCNAは辻ら<sup>39)</sup>に従い染色性の強弱に関わらず核

全体が陽性を示しているものを陽性細胞と判断した。癌遺伝子産物、癌抑制遺伝子産物についてはその染色性を問わず陽性反応を認めた細胞を陽性と判断した。

PCNA, 癌遺伝子産物, 癌抑制遺伝子産物の陽性細胞率は, 免疫染色を施した切片を光学顕微鏡 (Nikon 社, Labophot) を使用して, 400 倍率 (接眼レンズ:  $\times 10$ , 対物レンズ:  $\times 40$ ) で観察し, 無作為に選んだ 5ヶ所について 1000 個以上の腫瘍細胞に対する陽性細胞の比として算定し, 平均値  $\pm$  S.D. として検討した。癌遺伝子産物, 癌抑制遺伝子産物の陽性細胞率の判定は,  $\pm$ : 陽性率 0~10%,  $+$ : 10~40%,  $++$ : 40~70%,  $+++$ : 70~100%とした。平均値の差の検定は Mann-Whitney 検定を, 癌遺伝子産物, 癌抑制遺伝子産物の陽性細胞率と PCNA 陽性率との相関性に関しては Spearman の順位相関係数を用い, 危険率 5% 未満で有意差ありと判定した。

表 2	使用抗体	希釈率
抗 PCNA 抗体	(PC10, Novocastra)	100倍
抗 c-myc 抗体	(9E10, Oncogene Science)	100倍
抗 v-H ras 抗体	(Y13-259, Oncogene Science)	20倍
抗 c-erbB-1 抗体	(29. 1. 1, Sigma)	100倍
抗 c-erbB-2 抗体	(3B 5, Oncogene Science)	200倍
抗 c-erbB-3 抗体	(RTJ 1, Novocastra)	20倍
抗 p53 抗体	(BP 53-12, Japan tanner)	100倍

### Ⅲ. 結 果

#### 1. 抗 PCNA 抗体による細胞増殖能の検討

検索したすべての腫瘍組織および対照組織において, PCNA 陽性所見を得た。エナメル上皮腫, エナメル上皮腫再発例, 悪性エナメル上皮腫, および正常組織の PCNA 陽性率をまとめると図 1 に示すとおりである。

対照症例: 成人正常歯肉上皮, 胎児歯槽粘膜上皮では, 基底細胞層, およびその上層 2~3 層に陽性細胞の分布を認め, それらは核全体に強い陽性所見を示す傾向にあった。PCNA 陽性率は, それぞれ  $7.5 \pm 1.9\%$ ,  $6.6 \pm 1.1\%$ であった。なお, 歯堤,



歯胚上皮細胞は、不規則に弱い陽性反応を示すのみであった。

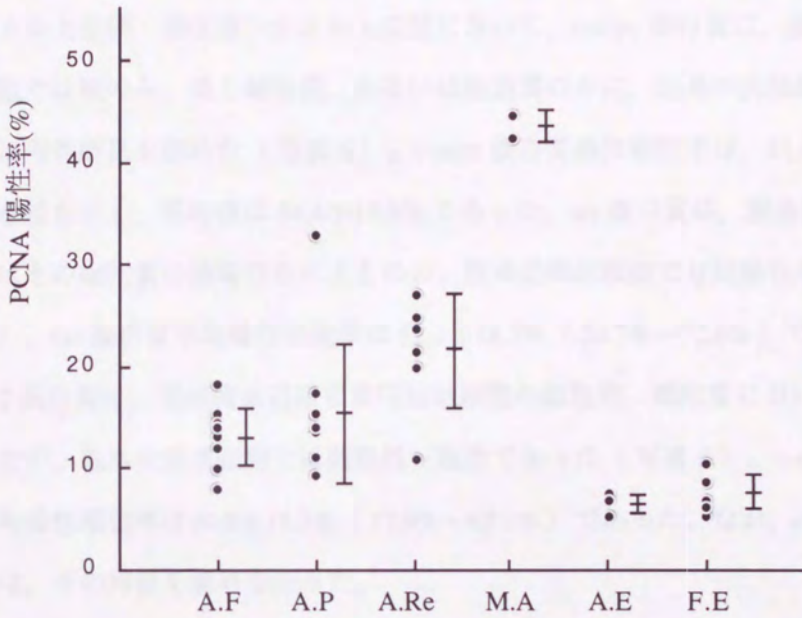
エナメル上皮腫：濾胞型エナメル上皮腫において、PCNA 陽性細胞は、腫瘍胞巣辺縁部の円柱状細胞に多く分布し、胞巣中央部細胞では陽性細胞をほとんど認めなかった（写真1）。その染色性に関しては、核全体に強い染色性を示すものと、核全体に弱い染色性を示すものが混在していた。濾胞型エナメル上皮腫におけるPCNA 陽性率は  $13.1 \pm 3.3\%$  ( $n=8$ ) であった。

叢状型エナメル上皮腫において、PCNA 陽性細胞は、胞巣辺縁部細胞のみならず腫瘍実質全体に散在し、それらの多くは、核全体に強い染色性を示した（写真2）。また、腫瘍細胞が充実性増殖を示す部位、歯堤状増殖を示す部位において多数のPCNA 陽性細胞を認めた。叢状型エナメル上皮腫におけるPCNA 陽性率は  $15.9 \pm 7.3\%$  ( $n=8$ ) であり、濾胞型エナメル上皮腫のPCNA 陽性率との間に有意差は認めなかった。また、他の叢状型エナメル上皮腫と比較して  $32.8\%$  と高い陽性率を示した症例が観察された（写真3）。

エナメル上皮腫再発例：PCNA 陽性細胞は、濾胞型では胞巣辺縁部細胞のみならず腫瘍胞巣全体に散在する傾向にあった（写真4）。叢状型では腫瘍胞巣全体に散在するとともに陽性細胞の増加傾向を認めた。また、混在型においてもPCNA 陽性細胞は特定の分布傾向を示さず、腫瘍胞巣全体に認められた。エナメル上皮腫再発例6例のPCNA 陽性率は  $21.1 \pm 5.7\%$  ( $n=6$ ) であり、エナメル上皮腫16例に比較し有意差を認めた。初発時から追跡した4例では、全て初発時と比較し再発時症例の方がPCNA 陽性率は高値を示した（表3）。初発時症例のPCNA 陽性率平均値は  $13.8 \pm 4.5\%$ 、再発時症例は  $22.2 \pm 2.2\%$  であり、再発時症例のPCNA 陽性率は初発時症例に比べ有意差を示した。

悪性エナメル上皮腫：PCNA 陽性細胞は、腫瘍構成細胞において特定の局在を示さず、胞巣全体に多数認められ、それらの多くは核全体に強い染色性を示した（写真5）。悪性エナメル上皮腫は平均陽性率  $43.3 \pm 1.6\%$  ( $n=2$ ) であり、エナメル上皮腫に比べ約2倍の値を示し、有意に高値であった。

図1 エナメル上皮腫，正常組織におけるPCNA陽性率



A.F : 濾胞型エナメル上皮腫 (n=8)  
 A.P : 叢状型エナメル上皮腫 (n=8)  
 A.Re : 再発エナメル上皮腫 (n=6)  
 M.A : 悪性エナメル上皮腫 (n=2)  
 A.E : 胎児歯槽粘膜 (n=3)  
 F.E : 正常歯肉 (n=5)

\*P<0.05 (comparing A.F, A.P, and A.Re to M.A)  
 \*P<0.05 (comparing A.E and F.E to M.A)

表3 エナメル上皮腫再発例のPCNA陽性率

症例	初発時 (組織型)	再発時 (組織型)
1	13.8% (濾胞型)	21.1% (濾胞型)
2	7.8% (濾胞型)	23.4% (濾胞型)
3	18.6% (濾胞型)	24.6% (濾胞型)
4	15.2% (叢状型)	19.6% (混在型)
Mean ± S.D.	13.8 ± 4.5%	22.2 ± 2.2%

\*P<0.05 (comparing Mean 13.8% to Mean 22.2%)

## 2. 癌遺伝子産物の発現

エナメル上皮腫：濾胞型エナメル上皮腫において、c-myc 蛋白質は、腫瘍胞巣辺縁部細胞では核のみ、核と細胞質、あるいは細胞質のみに、胞巣中央部細胞ではその核内に陽性所見を認めた（写真6）。c-myc 蛋白質陽性細胞率は、21.0%～77.2%と広範な値を示し、平均値は  $54.4 \pm 19.9\%$  であった。ras 蛋白質は、腫瘍胞巣中央部細胞ではその細胞質に強陽性を示すものの、胞巣辺縁部細胞では弱陽性を示した（写真7）。ras 蛋白質平均陽性細胞率は  $52.3 \pm 18.2\%$ （20.7%～72.6%）であった。c-erbB-2 蛋白質は、腫瘍胞巣辺縁部高円柱状細胞の細胞膜、細胞質において強陽性を示したが、胞巣中央部細胞では弱陽性～陰性であった（写真8）。c-erbB-2 蛋白質の平均陽性細胞率は  $39.9 \pm 15.3\%$ （17.9%～67.1%）であった。なお、c-erbB-1,3 蛋白質は、その局在を認めなかった。

叢状型エナメル上皮腫において、c-myc 蛋白質は、腫瘍構成細胞全体にわたり、核と細胞質、あるいは細胞質のみに陽性所見を認めた（写真9）。c-myc 蛋白質の平均陽性細胞率は  $52.2 \pm 15.5\%$ （36.5%～79.6%）であった。ras 蛋白質は、胞巣辺縁部、中央部にかかわらず腫瘍構成細胞の細胞質において弱陽性所見を示した（写真10）。ras 蛋白質の平均陽性細胞率は  $50.5 \pm 25.3\%$ （7.2%～79.7%）であった。c-erbB-2 蛋白質は、腫瘍構成細胞全体で弱陽性～陰性であった（写真11）。c-erbB-2 蛋白質の平均陽性細胞率は  $15.7 \pm 11.67\%$ （3.1%～36.6%）であった。なお、c-erbB-1,3 蛋白質は、その局在を認めなかった。また、叢状型エナメル上皮腫の一部の症例で、c-myc 蛋白質が、腫瘍構成細胞全体にわたり核膜周囲の細胞質に強い陽性所見を認め、さらに、ras 蛋白質の染色性が著しく低下していた。

エナメル上皮腫再発例：c-myc と ras, c-erbB-2 蛋白質の染色性は、基本的には前述の組織型に類似したものであった。c-myc と ras, c-erbB-2 各蛋白質陽性細胞率は、それぞれ  $48.3 \pm 16.5\%$ （24.7%～70.9%）、 $31.5 \pm 23.0\%$ （6.4%～56.3%）、 $26.1 \pm 18.0\%$ （8.7%～46.5%）であった。また、一部の濾胞型エナメル上皮腫再発例で、c-myc 蛋白質は、腫瘍胞巣中央部細胞で核膜周囲の細胞質に強い陽性所見を認め、

さらに、ras 蛋白質の染色性は、腫瘍構成細胞全体にわたり著しく低下していた。

悪性エナメル上皮腫：c-myc 蛋白質は、腫瘍細胞核膜周囲の細胞質に強い陽性反応を示した（写真 12）。平均陽性細胞率は  $79.5 \pm 10\%$ （72.2%，86.7%）と高値を示した。ras 蛋白質は、一部の腫瘍細胞を除きその局在を認めなかった（写真 13）。ras 蛋白質の平均陽性細胞率は  $5.0 \pm 1.4\%$ （4.0%，6.0%）を示した。c-erbB-2 蛋白質はその局在をほとんど認めず、平均陽性細胞率は  $7.1 \pm 3.5\%$ （4.6%，9.5%）を示した（写真 14）。また、c-erbB-1,3 蛋白質は、ともに陰性であった。

### 3. p53 癌抑制遺伝子産物の発現

p53 蛋白質は、エナメル上皮腫 22 例中 2 例；叢状型エナメル上皮腫 1 例（写真 15），濾胞型エナメル上皮腫再発症例 1 例（写真 16），悪性エナメル上皮腫 2 例中 2 例（写真 17）において、腫瘍細胞の核内にその発現を認めた。それぞれの症例における p53 陽性細胞率は、叢状型エナメル上皮腫で 24.3%，濾胞型エナメル上皮腫再発例で 14.8%，悪性エナメル上皮腫で 38.6%，24.1% であった。また、同様の条件下で染色を行なった他のエナメル上皮腫，および隣接する口腔粘膜上皮等の正常組織では p53 蛋白質の発現を認めなかった。

### 4. 各種遺伝子産物の発現と、PCNA 陽性率の関連性

エナメル上皮腫，悪性エナメル上皮腫において、c-myc 蛋白質陽性細胞率は PCNA 陽性率と正の相関を示した（図 2）。また、ras 蛋白質陽性細胞率は PCNA 陽性率と負の相関を示した（図 3）。c-erbB-2 蛋白質陽性細胞率と PCNA 陽性率との間に有意な相関は認められなかった（図 4）。p53 蛋白質の発現を認めた症例の PCNA 陽性率は、叢状型エナメル上皮腫 32.8%，濾胞型エナメル上皮腫再発例 26.9%，悪性エナメル上皮腫 44.4%，42.1% といずれも高値を示した（図 5）。

表 4 は、検索したエナメル上皮腫，悪性エナメル上皮腫を，その組織診断に関係なく，PCNA 陽性率の低い症例から順にならべ，それぞれの症例における c-myc，ras，c-erbB-2，p53 各蛋白質の陽性細胞率を一覧にしたものである。

c-myc : + + + , ras : ± , p53 : + を示した症例が、悪性エナメル上皮腫 2 例と、PCNA 陽性率でエナメル上皮腫中最高値を示した叢状型エナメル上皮腫、次いで高値を示した濾胞型エナメル上皮腫再発例であり、この 4 症例は陽性細胞率の一致のみならず、各蛋白質の染色性も類似したものであった。すなわち、p53 蛋白質の発現を認め、c-myc 蛋白質は核膜周囲の細胞質に強い局在を示した。さらに、ras 蛋白質はその染色性の著しい低下を示した。



図2 c-myc 蛋白質陽性率と PCNA 陽性率

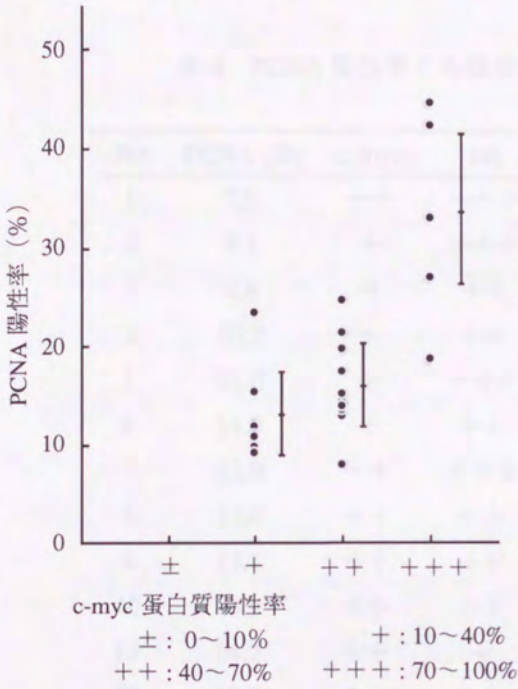


図3 ras 蛋白質陽性率と PCNA 陽性率

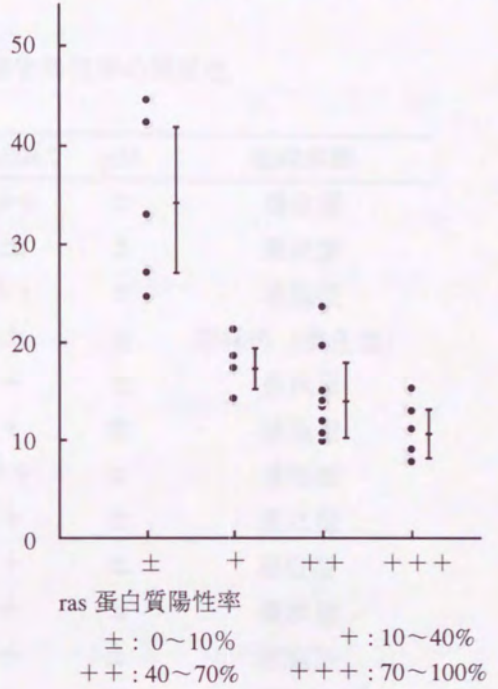


図4 c-erbB-2 蛋白質陽性率と PCNA 陽性率

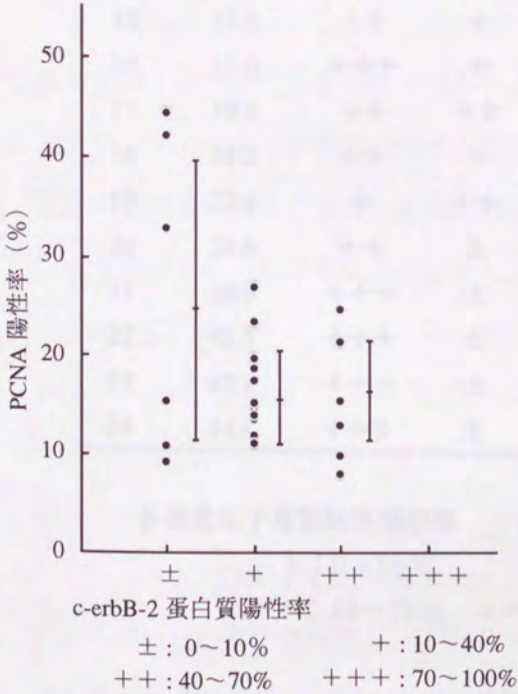


図5 p53 蛋白質陽性率と PCNA 陽性率

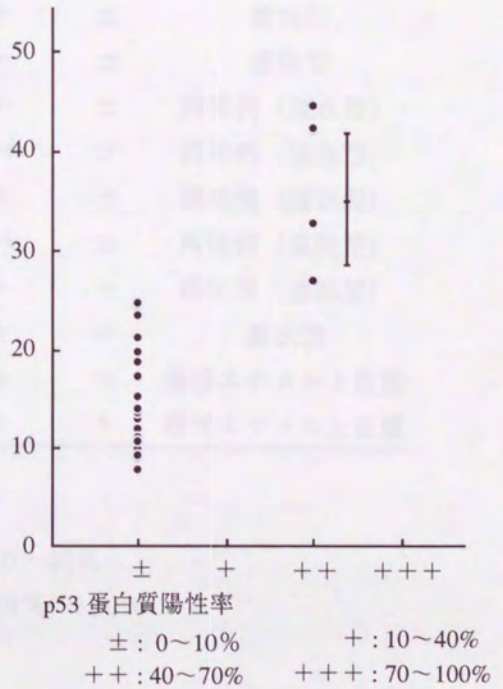


表4 PCNA 陽性率と各種遺伝子産物陽性率の関連性

No.	PCNA (%)	c-myc	ras	c-erbB-2	p53	組織診断
1	7.8	++	+++	++	±	濾胞型
2	9.1	+	+++	±	±	叢状型
3	9.8	+	++	++	±	濾胞型
4	10.7	+	++	±	±	再発例 (混在型)
5	11.0	+	+++	+	±	叢状型
6	11.9	+	++	+	±	濾胞型
7	12.9	++	+++	++	±	濾胞型
8	13.4	++	++	+	±	叢状型
9	13.8	++	++	+	±	濾胞型
10	13.9	++	++	+	±	叢状型
11	14.2	++	+	+	±	濾胞型
12	15.0	++	++	+	±	叢状型
13	15.2	+	++	++	±	濾胞型
14	15.2	+	+++	±	±	叢状型
15	17.3	++	+	+	±	叢状型
16	18.6	+++	+	+	±	濾胞型
17	19.6	++	++	+	±	再発例 (混在型)
18	21.2	++	+	++	±	再発例 (濾胞型)
19	23.4	+	++	+	±	再発例 (濾胞型)
20	24.6	++	±	++	±	再発例 (濾胞型)
21	26.9	+++	±	+	+	再発例 (濾胞型)
22	32.8	+++	±	±	+	叢状型
23	42.1	+++	±	±	+	悪性エナメル上皮腫
24	44.4	+++	±	±	+	悪性エナメル上皮腫

各種遺伝子産物陽性細胞率

± : 0~10%      + : 10~40%

++ : 40~70%    +++ : 70%~100%

#### IV. 考 察

##### 1. エナメル上皮腫，悪性エナメル上皮腫の細胞増殖能

本研究結果では，濾胞型エナメル上皮腫と叢状型エナメル上皮腫を比較すると，PCNA 陽性細胞の分布状態は明らかに異なっていた。すなわち，濾胞型エナメル上皮腫では，PCNA 陽性細胞は腫瘍胞巣辺縁部の円柱状細胞に多く分布し，胞巣中央部細胞で極めて少ない傾向にあったのに対し，叢状型エナメル上皮腫では，腫瘍構成細胞全体に陽性細胞が散在した。従来，濾胞型エナメル上皮腫の高円柱状細胞はエナメル芽細胞への分化を示すとされている<sup>40)</sup>。Heikinheimoら<sup>41)</sup>，長塚<sup>40)</sup>，永井ら<sup>42)</sup>は，サイトケラチンの免疫組織化学的検索結果から，濾胞型エナメル上皮腫の高円柱状細胞が単層上皮細胞への分化を示すとともに低分子のサイトケラチンを含むことを明らかにしている。さらに，サイトケラチン分布は歯胚の内エナメル上皮と類似しているものの，アメロジェニン産生を欠いていることから，それらはエナメル芽細胞としての機能分化に乏しいと報告している。本研究結果から，濾胞型エナメル上皮腫の高円柱状細胞は，歯胚や歯堤上皮に比べて明らかに強い増殖能を有し，これらの高円柱状細胞は従来考えられているより増殖能の高い，低分化な腫瘍細胞であることが示唆された。さらに，このことは濾胞型エナメル上皮腫の侵襲的な増殖態度と関連性があることが推測される。また，胞巣中央部腫瘍細胞はPCNA 陰性の細胞群であったことから，濾胞型エナメル上皮腫の胞巣中央部は増殖能に乏しいことが示唆される。また，叢状型エナメル上皮腫では，そのサイトケラチンの分布から扁平上皮的性格を有していることが明らかにされているが<sup>40)</sup>，本研究結果から腫瘍胞巣全体にPCNA 陽性細胞が存在することが示された。このことから，腫瘍胞巣全体に増殖能の高い腫瘍細胞群が潜在していることが推測された。

エナメル上皮腫は，再発を繰り返すうちにその組織像が変化することが知られている。すなわち，久保田ら<sup>43)</sup>はエナメル上皮腫の再発腫瘍の組織学的特徴として，濾胞型を示す傾向にあること，細胞密度が高いこと，定型的なエナメル髓構造に乏しく扁平上皮化生を示す傾向にあること等を挙げている。これらの組織学



時の特徴は、本研究で検索した再発症例の組織像とはほぼ一致するものの、扁平上皮化生を示す傾向は特に認められなかった。再発症例における PCNA 陽性細胞は、濾胞型、叢状型ともに胞巣辺縁部細胞のみならず、胞巣中央部細胞にも認められる傾向にあり、それらの初発時に見られた陽性細胞の分布とは異なっていた。さらに初発時から経過観察した 4 例に関しては、全ての症例で、初発時よりも再発時の方が PCNA 陽性率は高値を示した。すなわち、初発時における PCNA 陽性率の平均値は  $13.8 \pm 4.5\%$ 、再発時では  $22.2 \pm 2.2\%$  であり、再発時症例における PCNA 陽性率は初発時に比べ有意に高値を示した。この結果は、エナメル上皮腫が再発を繰り返すうちにその組織像が変化するのみならず、増殖細胞の分布パターンが変化すること、腫瘍細胞の増殖能が高まることを示唆している。したがって、本研究結果は、エナメル上皮腫が再発をすることにより、初発時に比較してより侵襲性増殖を示すとの報告<sup>44,45)</sup>を裏付けるものである。

本研究で検討した悪性エナメル上皮腫は、2 例ともに原発部位の一部では典型的な濾胞型エナメル上皮腫の組織像を呈しつつ、連続的に異型性を有する腫瘍組織への移行を示した症例である。エナメル上皮腫の組織像を示す部位の PCNA 染色所見は濾胞型エナメル上皮腫と同様であったが、異型性を有する腫瘍組織へ移行する部位において、PCNA 陽性細胞数の著明な増加および染色性の増強を認めた。悪性エナメル上皮腫の PCNA 陽性率は、 $43.3 \pm 1.6\%$  であり、エナメル上皮腫に比べ有意に高値であった。本研究から得られたエナメル上皮腫と悪性エナメル上皮腫の PCNA 陽性率の明確な差異は、PCNA の免疫組織化学的検索が両者を鑑別するうえにおいて極めて有効かつ簡便な方法であることを示すとともに、PCNA の免疫組織化学的検索が、エナメル上皮腫の客観的な増殖能の指標として有用であることが示唆された。

## 2. エナメル上皮腫、悪性エナメル上皮腫における癌遺伝子産物の発現

本研究において、c-myc 蛋白質は、濾胞型エナメル上皮腫、腫瘍胞巣中央部細胞では核内に、辺縁部円柱状細胞では核のみ、核と細胞質、あるいは細胞質のみ

と、多様な染色性を示した。また、叢状型エナメル上皮腫では腫瘍構成細胞全体にわたり、核と細胞質、あるいは細胞質のみに局在した。myc 蛋白質の細胞内局在に関する研究より、myc 蛋白質は、正常細胞株では核内に分布するが、細胞分裂期には細胞質に分散することが報告されている<sup>10, 46)</sup>。本研究において、濾胞型エナメル上皮腫の胞巣辺縁部細胞、叢状型エナメル上皮腫の腫瘍構成細胞全体に増殖能を有する腫瘍細胞が多く存在することを先に示したが、これらの腫瘍構成細胞において c-myc 蛋白質の細胞質への局在分布を認めた。さらに c-myc 蛋白質陽性細胞率は PCNA 陽性率と正の相関を示した。本結果から、c-myc 蛋白質は、エナメル上皮腫において細胞質へ分散しながら細胞増殖に関与することが示唆された。また、c-myc 蛋白質の免疫組織化学的検索において、組織の悪性化に伴い細胞質への局在傾向を示すこと、分化度が低い腫瘍組織で細胞質への局在を示すことが報告されている<sup>33, 34)</sup>。本研究結果では、c-myc 蛋白質は、悪性エナメル上皮腫において核膜周囲の細胞質に強い陽性反応を示した。また PCNA 陽性率で高値を示したエナメル上皮腫で悪性エナメル上皮腫に類似した染色性を示す症例が存在した。このような c-myc 蛋白質の染色性がエナメル上皮腫の悪性能を反映しているのかもしれない。

本研究に使用した抗 ras モノクローナル抗体 (Y13-259) は、H-ras, K-ras および N-ras 癌遺伝子産物を認識することが確認されている<sup>47)</sup>。これまでに様々な腫瘍組織に関する ras 蛋白質の免疫組織化学的検索が報告されており、腫瘍組織の悪性度や予後との相関がみられたとの報告もあるが<sup>35, 36)</sup>、諸家の結果が一致しない場合も多い。本研究結果より、エナメル上皮腫において ras 蛋白質は、PCNA 陽性細胞をほとんど認めない濾胞型エナメル上皮腫の胞巣中央部細胞にのみ強陽性を示した。さらに、ras 蛋白質陽性細胞率は PCNA 陽性率と負の相関を示した。ras 蛋白質の生理的機能に関して、様々な種類の細胞において細胞ごとに異なるシグナル、すなわち増殖や分化、細胞維持などのシグナルを伝達していることが明らかとなっている<sup>24)</sup>。本研究結果から、エナメル上皮腫において ras 蛋白質は、増殖を直接促進する作用はないと考えられたが、その機能に関しては

さらに詳細な検討が必要であると思われる。また、悪性エナメル上皮腫および PCNA 陽性率で高値を示した一部のエナメル上皮腫において陽性細胞率の減少や染色性の低下を認めたことから、このような ras 蛋白質の局在が悪性能の指標となる可能性が示唆された。

c-erbB-2 蛋白質は、PCNA 陽性細胞が多く認められた濾胞型エナメル上皮腫の胞巣辺縁部円柱状細胞で強陽性を示すものの、叢状型エナメル上皮腫や悪性エナメル上皮腫での染色性は低かった。また、c-erbB-2 蛋白質陽性細胞率と PCNA 陽性率との間に有意な相関はみられず、増殖能の異なるエナメル上皮腫症例において一定の染色傾向を示さなかった。辻ら<sup>48)</sup>は、唾液腺腫瘍を検索組織とした c-erbB-2 蛋白質の免疫組織化学的検索において、腺管様構造を示す腫瘍細胞や正常唾液腺導管細胞において陽性所見を得たことから、本蛋白質が細胞分化に関与していると推測している。また、Heikinheimoら<sup>41)</sup>、長塚<sup>40)</sup>はサイトケラチンの免疫組織学的検索結果から、濾胞型エナメル上皮腫の高円柱状細胞が単層上皮細胞への分化を示すことを報告している。本研究において、c-erbB-2 蛋白質が濾胞型エナメル上皮腫の円柱状細胞にのみ強い陽性所見を認めたことから、本蛋白質は、エナメル上皮腫の円柱状細胞において単層上皮への分化に関する役割を担うことが示唆された。c-erbB-1, 2, 3 蛋白質の発現に関しては、臓器特異性があることが知られているが、本研究結果より、c-erbB-1, 3 蛋白質はエナメル上皮腫の腫瘍発生、増殖等に関与しないものと考えられた。

### 3. エナメル上皮腫における p53 癌抑制遺伝子産物の発現

野生型 p53 蛋白質分子は、細胞内における代謝半減期が非常に短く 6~20 分程であるのに対し、変異型 p53 蛋白質では 4~8 時間と延長し細胞内に過剰蓄積することから、免疫組織化学的に検出可能となる<sup>49)</sup>。さらに、野生型 p53 蛋白質が DNA 型がんウイルスである SV40 の LT 抗原と結合すると、野生型 p53 蛋白質の機能が失われると共に p53 蛋白質の代謝半減期が延長することが知られており<sup>50)</sup>、このような状態でも、p53 蛋白質は免疫組織化学的に発現すると推測される。

いずれにしても、免疫組織化学的に検出する p53 蛋白質は異常な状態にあると考えられる。p53 蛋白質の免疫組織化学的検索は、消化器癌<sup>51)</sup>や乳癌<sup>52)</sup>、肺癌<sup>53)</sup>など多くの悪性腫瘍に関して報告されており、口腔領域の悪性腫瘍についても、扁平上皮癌等に関する報告がみられる<sup>54,55)</sup>。本研究で使用した抗 p53 モノクローナル抗体 (BP 53-12) は野生型から得られた抗体であり、野生型および変異型 p53 蛋白質の N 末端に近いアミノ酸をエピトープとし、ホルマリン固定パラフィン包埋組織での検索が可能とされている<sup>56)</sup>。

本研究の結果、エナメル上皮腫 22 例中 2 例、悪性エナメル上皮腫 2 例中 2 例において p53 蛋白質の発現を認めた。これらの症例において p53 蛋白質の過剰発現を認めたことから、他臓器の各種悪性腫瘍と同様に、歯原性悪性腫瘍においても p53 蛋白質の異常が生じていることが示唆された。さらに、悪性腫瘍や前癌病変に特有の現象として捉えられている p53 蛋白質の発現が、少数例ながらエナメル上皮腫において認められたことは興味深いと思われる。p53 蛋白質の発現を認めたエナメル上皮腫 2 例はともに PCNA 陽性率で高値を示しており、腫瘍組織の増殖能が高いことが示されている。これまでに、野生型 p53 蛋白質が PCNA の mRNA の発現を抑制し、その結果細胞周期が G<sub>1</sub> 期から S 期へ移行する時点で停止することが報告されている<sup>57)</sup>。また、Waga ら<sup>31)</sup> は、野生型 p53 蛋白質が PCNA の活性を阻害する働きを持つ p21 蛋白質の発現を誘発するために DNA 合成期への進行が停止するという機構を報告した。p53 蛋白質陽性を示した症例では、このような野生型 p53 蛋白質の機能が失われることにより PCNA が活性化し、PCNA 陽性率が増加した可能性が示唆された。さらに、これらのエナメル上皮腫において p53 蛋白質の異常が生じていることが示唆されるとともに、p53 蛋白質の発現がエナメル上皮腫の悪性能の指標として有用であると考えられた。

#### 4. エナメル上皮腫の潜在的悪性能

エナメル上皮腫の中には形態学的に異型的変化を伴わないエナメル上皮腫転移症例<sup>1,2,45,58)</sup>や再発を繰り返すうちに悪性転化した症例が報告されており<sup>44,59)</sup>、エ

ナメル上皮腫の潜在的悪性能を示唆する報告もみられる<sup>1,2)</sup>。

本研究において、写真3に示す症例は叢状型エナメル上皮腫の組織像を示しつつ、細胞密度が若干高く、腫瘍細胞は核濃縮を示す傾向にあったが、明らかな細胞学的悪性所見に欠けていた。本症例ではPCNA陽性率は32.8%とエナメル上皮腫中最高値を示した。また、PCNA陽性率で次いで高値を示した(26.9%)濾胞型エナメル上皮腫再発例は、基本的に濾胞型エナメル上皮腫の組織像を示すものの、細胞密度が高く、塊状の胞巣を形成する傾向が認められた。さらに、これらの症例は、各種癌遺伝子産物とp53癌抑制遺伝子産物の免疫染色結果で、c-myc:+++、ras:±、p53:+を示しており、その染色性は悪性エナメル上皮腫2例と酷似するものであった。

悪性エナメル上皮腫は、組織学的にエナメル上皮腫の基本構造をとりながら細胞学的に悪性像を示すものと定義付けられている<sup>38)</sup>が、組織学的にその診断は困難なことが少なくない。Kunzeら<sup>1)</sup>は、エナメル上皮腫の形態学的悪性基準が明確でないことが、本腫瘍の良悪性の判断を困難にしていると報告している。しかし、現在エナメル上皮腫の良悪性に関する診断基準は純形態学的な所見に基づいており客観的な基準はない。Mullerら<sup>60)</sup>は、エナメル上皮腫と悪性エナメル上皮腫に関して、image cytometry, flow cytometryを用いて核DNA量を定量し、エナメル上皮腫18%、エナメル上皮腫再発例40%、悪性エナメル上皮腫80%で異数倍体を認め、異数倍体がエナメル上皮腫の悪性の指標になることを示唆している。

本研究において、悪性エナメル上皮腫に類似した染色所見を示した一部のエナメル上皮腫は、組織学的に悪性像を認めないながらも細胞学的悪性能を有することが示唆されるとともに、本結果がエナメル上皮腫の侵襲的増殖態度や再発、転移などを起こしうる生物学的性格を反映しているものと考えられた。

以上、今回の免疫組織化学的検索より、PCNA、癌遺伝子産物、癌抑制遺伝子産物は、エナメル上皮腫、悪性エナメル上皮腫において様々な局在様式を示し、腫瘍組織の増殖、分化等に関与すると考えられた。さらに、今後の分子生物学的解析を含めた詳細な研究の基礎的データとなるものと考えられた。

## V. 結 論

今回、著者は、エナメル上皮腫、悪性エナメル上皮腫における細胞増殖能、および癌遺伝子産物、癌抑制遺伝子産物に関する免疫組織化学的検索を施行し、以下の結論を得た。

1. エナメル上皮腫の主要な組織型である濾胞型エナメル上皮腫と叢状型エナメル上皮腫との間で、PCNA 陽性細胞の分布状態は異なっていたが、PCNA 陽性率の差異は認めなかった。
2. エナメル上皮腫再発例の PCNA 陽性率はその初発時症例群に比べ有意に高値を示し、エナメル上皮腫再発時における腫瘍細胞の増殖能増加が示された。
3. 悪性エナメル上皮腫の PCNA 陽性率は、エナメル上皮腫に比べ有意に高値を示し、PCNA がエナメル上皮腫の増殖能の指標として有用であることが示された。
4. c-myc 蛋白質は、PCNA 陽性率と正の相関を示し、増殖活性の高い腫瘍構成細胞で細胞質への局在傾向を認めた。本結果より、c-myc 蛋白質は、エナメル上皮腫において細胞質へ分散しながら細胞増殖に関与することが示唆された。
5. ras 蛋白質は、PCNA 陽性率と負の相関を示し、増殖能が高い腫瘍構成細胞で染色性の低下を認めた。本結果より、ras 蛋白質は、エナメル上皮腫において細胞増殖を直接促進する働きはないと考えられた。
6. c-erbB-2 蛋白質は、PCNA 陽性率との有意な相関は認めなかったが、濾胞型エナメル上皮腫の胞巣辺縁部高円柱状細胞の分化に関与することが示唆された。
7. p53 蛋白質は、PCNA 陽性率で高値を示した悪性エナメル上皮腫と一部のエナメル上皮腫で発現を認め、これらの症例における p53 蛋白質の異常が示唆された。

本研究において、c-myc, ras, p53 蛋白質の免疫染色結果より、PCNA 陽性率で高値を示した一部のエナメル上皮腫で、悪性エナメル上皮腫に類似した陽性細胞率および染色性を認めたことから、これらのエナメル上皮腫が、悪性エナメル上皮腫に類似した生物学的性格を有することが示唆された。以上より、PCNA, c-myc, ras, p53 各蛋白質の免疫組織化学的検索が、エナメル上皮腫の細胞学的悪性能に対するスクリーニングとして有用であることが示唆された。

## VI. 謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました岡山大学歯学部口腔病理学講座主任、永井教之教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し御懇切な御助言と御鞭撻を頂いた同講座長塚 仁助教授を始め、御協力を頂いた講座教室各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は第 35 回歯科基礎医学会総会（平成 5 年 10 月，長崎），第 36 回歯科基礎医学会総会（平成 6 年 10 月，大阪）において発表した。

## VI. 文 献

- 1) Kunze, E., Donath, K., Luhr, H. G., Engelhardt, W. and Vivie, R. D. : Biology of metastasizing ameloblastoma. *Path. Res. Pract.*, 180, 526-535, 1985.
- 2) Edward H. and Laughlin M. D. : Metastasizing ameloblastoma. *Cancer*, 64, 776-780, 1989.
- 3) Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. and Stein, H. : Production of a mouse monoclonal antigen reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*, 31, 13-20, 1983.
- 4) Gratzner, H. G. : Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218, 474-475, 1982.
- 5) Miyachi, K., Fritzler, M. J. and Tan, E. M. : Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.*, 121, 2228-2234, 1978.
- 6) Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A. and Bravo, H. M. : Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature*, 326, 515-517, 1987.
- 7) Prelich, G., Tan, C. K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M. and Stillman, B. : Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- $\delta$  auxiliary protein. *Nature*, 326, 517-521, 1987.
- 8) Takasaki, Y., Deng, J. S. and Tan, E. M. : A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J. Exp. Med.*, 154, 1899-1909, 1981.
- 9) 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.
- 10) Siitonen, S. M., Isola, J. J., Rantala, I. S. and Helin, H. J. : Intratumor variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis. *Anatomic Pathol.*, 99, 226-231, 1993.
- 11) Fontanini, G., Macchiarini, P., Pepe, S., Ruggiero, A., Hardin, M., Bigini, D., Vignati, S., Pingitore, R. and Angeletti, A. : The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer*, 70, 1520-1526, 1992.
- 12) Robbins, B. A., Vega, D., Ogata, K., Tan, E. M. and Nakamura, R. M. : Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 111, 841-845, 1987.
- 13) Field, J. K. : Oncogenes and tumour-suppressor genes in Squamous cell carcinoma of the



head and neck. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, 28B-1, 67-76, 1992.

14) Field, J. K. and Spandidos, D.A. : Expression of oncogenes in human tumours with special reference to the head and neck region. *J. Oral Pathol.*, 16, 97-107, 1987.

15) Mulder, K. M. and Brattain, M. G. : Alterations in c-myc expression in relation maturational status of human colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 42, 64-70, 1988.

16) Bos, J. L. : The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Research*, 195, 255-271, 1988.

17) Slamon, D. J., Clark, G. M., Wang, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. and McGuire, W. L. : Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235, 177-182, 1987.

18) Hollstein, M., Sidransky D., Vogelstein, B. and Harris, C. C. : p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-53, 1991.

19) Bishop, J. M. : Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 301-354, 1983.

20) Eisenman, R. N., Tachibana, C. Y., Abrams, H. D. and Hann, S. R. : V-myc and c-myc encoded proteins are associated with the nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 114-126, 1985.

21) Blackwood, E. M. and Eisenman, R. N. : Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with myc. *Science*, 251, 1211-1217, 1991.

22) Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. : Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 851-891, 1993.

23) Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Nakamura, S. and Kaziro, Y. : Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21<sup>ras</sup>, GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 5993-5997, 1990.

24) Satoh, T., Nakafuku, M. and Kaziro, Y. : Function of ras a molecular switch in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 2419-24152, 1992

25) Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. : A v-erbB related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB1/epidermal growth factor receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 6497-6501, 1985.

26) Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T. and Toyosima, K. : Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*, 319, 230-234, 1986.

27) Bacus, S. S., Gudkov, A. V., Zelnick, C. R., Stern, D. C. R., Stancovski, I., Peles, E.,

- Farbstein, H., Lupe, R., Wen, D., Sela, M. and Yarden, Y. : Neu differentiation factor (Heregulin) induces expression of intercellular adhesion molecule 1 : implications for mammary tumors. *Cancer Res.*, 53, 5251-5261, 1993.
- 28) Nigro, J. M., Baker S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F. S., Weston, A., Modali, R., Harris, C. C. and Vogelstein, B. : Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 342, 705-708, 1989.
- 29) Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R and Vogelstein, B. : Chromosome 17 Deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244, 217-221, 1989.
- 30) Milner, J. : The role of p53 in the normal control of cell proliferation. *Current Opinion in Cell Biology*, 3, 282-286, 1991.
- 31) Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B. : The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 369, 574-578, 1994.
- 32) Kashima, K., Yokoyama, S., Nakayama, I. and Noguchi, S. : Immunohistochemical study on expression of c-myc, p53, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor in human thyroid tumors. *Acta Histochem. Cytochem.*, 24, 563-570, 1991.
- 33) Kumamoto, H., Ooya, K. and Sasano, H. : Immunohistochemical localization of c-myc oncogene protein correlated with malignancy of oral epithelium. *Jpn. J. Oral Biol.*, 33, 315-319, 1991.
- 34) Polaczar, S. V., Hey, N. A., Stephenson, T. J. and Hill, A. S. : c-myc oncogene product P62<sup>c-myc</sup> in ovarian mucinous neoplasms : immunohistochemical study correlated with malignancy. *J. Clin. Pathol.*, 42, 148-152, 1989.
- 35) Agnantis, N. J., Apostolikas, N., Sficas, C., Zolota, V. and Spandidos, D. A. : Immunohistochemical detection of ras p21 and c-myc p62 in colonic adenomas and carcinomas. *Hepato-Gastroenterol.*, 38, 239-242, 1991.
- 36) Sun, X. F., Hatschek, T., Stal, O., Carstensen, J. M., Zhang, H., Boeryd, B., Sjudahl, R. and Nordenskjold, B. : Ras p21 expression in relation to histopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Acta. Oncologica.*, 30, 933-939, 1991.
- 37) Sandros, J., Heikinheimo, K., Happonen, R. P. and Stenman, G. : Expression of p21<sup>ras</sup> in odontogenic tumors. *APMIS*, 99, 15-20, 1991.
- 38) Kramer I. R. H., Pindborg J. J. and Shear, M. : Histological classification of odontogenic

tumors. 2nd Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1-27, 1992.

- 39) 辻 龍雄, 佐々木功典, 木村由香, 前田寛治, 金子昭啓, 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.
- 40) 長塚 仁: エナメル上皮腫の免疫組織化学的, 電子顕微鏡的研究, 特にサイトケラチンと中間径フィラメントについて. 岡山歯誌, 10, 37-52, 1991.
- 41) Heikinheimo, K., Hormia, M., Stenman, G., Virtanen, I. and Happonen, R. P. : Patterns of expression of intermediate filaments in ameloblastoma and human fetal tooth germ. *J. Oral Pathol. Med.*, 18, 264-273, 1989.
- 42) 永井教之, 竹下信義, 長塚 仁, 赤木 巧, 山崎正子, 野島鉄人, 高木 亨, 久保木芳徳: 歯原性上皮性腫瘍の細胞骨格・アメリジェニン・エナメリンの局在に関する免疫組織化学的検討. 日口科誌, 40, 746-752, 1991.
- 43) 久保田文良, 本間 学, 山田哲司, 大久保滋郎, 松田 登: エナメル上皮腫の再発と組織学的変化. 日口外誌, 24, 103-107, 1978.
- 44) Slootweg, P. J. and Muller, H. : Malignant ameloblastoma or ameloblastic carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 57, 167-179, 1984.
- 45) Lash, M. and McCoy, G. : Ameloblastoma of the mandible with distant metastasis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 78, 430-435, 1969.
- 46) Widqvist, R., Saksela, K. and Alitalo, K. : The myc proteins are not associated with chromatin in mitotic cells. *EMBO J.*, 3, 2947-2950, 1984.
- 47) Furth, M. E., Aldrich, T. H. and Cordon-Cardo, C. : Expression of ras protooncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene*, 1, 47-58, 1987.
- 48) 辻 龍雄, 田垣内幸士, 木村由香, 鈴木通彦, 佐々木功典, 篠崎文彦: 口腔腫瘍における c-erbB-2 遺伝子産物関連抗原の発現. 日口外誌, 37, 944-947, 1991.
- 49) Finlay, C. A., Hinds, P. W., Tan, T. H., Eliyahu, D., Oren, M. and Levine, A. J. : Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 70-p53 complex with an altered half-life. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 531-539, 1988.
- 50) Mietz, J. A., Unger, T., Huibregtse, J. M. and Howley, P. M. : The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV 40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.*, 11, 5013-5020, 1992.
- 51) Monden, T., Morimoto, H., Nakanishi, H., Fukunaga, M., Shimono, T. and Mori, T. : A comparative immunohistochemical study of p53 and heat shock protein expression in microwave-fixed, paraffin-embedded sections of colorectal tumors. *Acta Histochem.*

Cytochem., 25, 583-590, 1992.

52) Cattoretti, G., Rilke, F., Salvatore, A. and Delia, D. : P53 expression in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 41, 178-183, 1988.

53) Iggo R., Gatter K., Bartek, J., Lane, D. and Harris, A. L. : Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335 : 675-679, 1990.

54) Warnakulasuriya, K. A. A. S. and Johnson, N. W. : Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J. Oral Pathol. Med.*, 21, 404-408, 1992.

55) 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 p53 の免疫組織化学的検索. *日口外誌*, 38, 1274-1279, 1992.

56) Bartek J., Bartkova J., Vojtesek, B., Staskova, Z., Lukas, J., Rejthar, A., Kovarik, J., Midgley, C. A., Gannon, J. V. and Lane, D. P. : Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6 : 1699-1703, 1991.

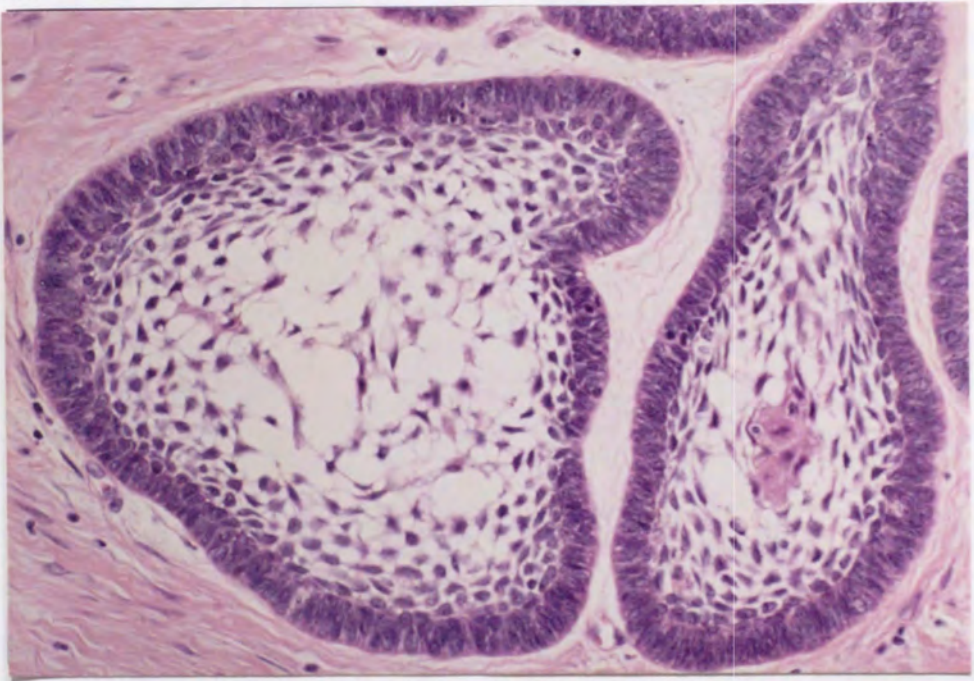
57) Mercer, W. E., Shields, M. T., Lin, D., Appella, E. and Ullrich, S. J. : Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating cell nuclear antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1958-1962, 1991.

58) Hoke, H. F. and Harrelson, A. B. : Granular cell ameloblastoma with metastasis to the cervical vertebrae. Observation on the origin of the granular cells. *Cancer*, 20, 991-999, 1967.

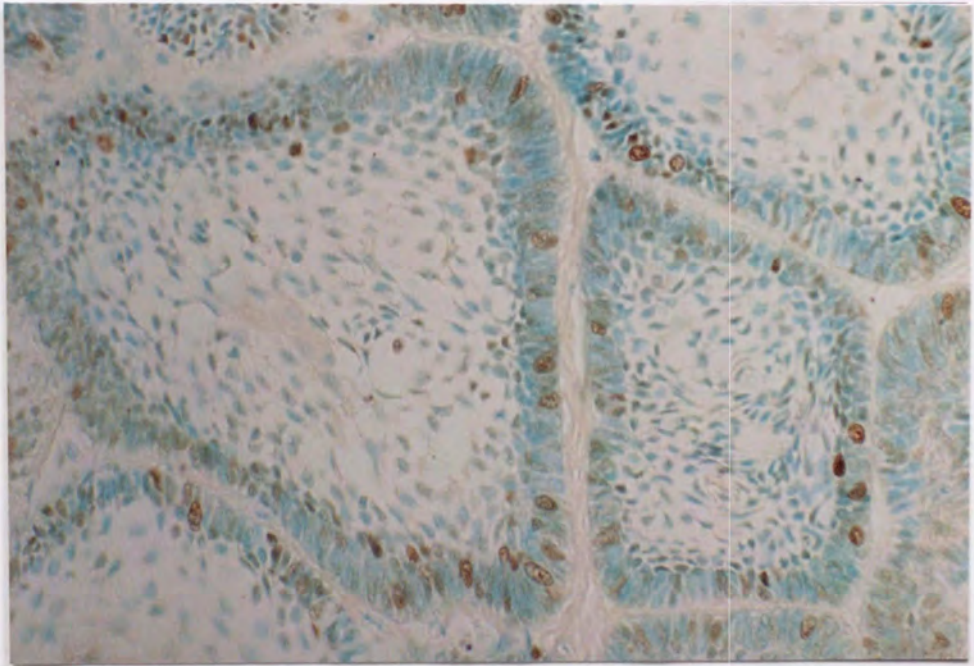
59) Ikemura, K., Tashiro, H., Fujino, H., Ohbu, D. and Nakajima, K. : Ameloblastoma of the mandible with metastasis to the lungs and lymph nodes. *Cancer*, 29, 930-940, 1972.

60) Muller, S., Derose, P. B. and Cohen, C. : DNA ploidy of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma of the jaw. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 117, 1126-1131, 1993.

写真1.

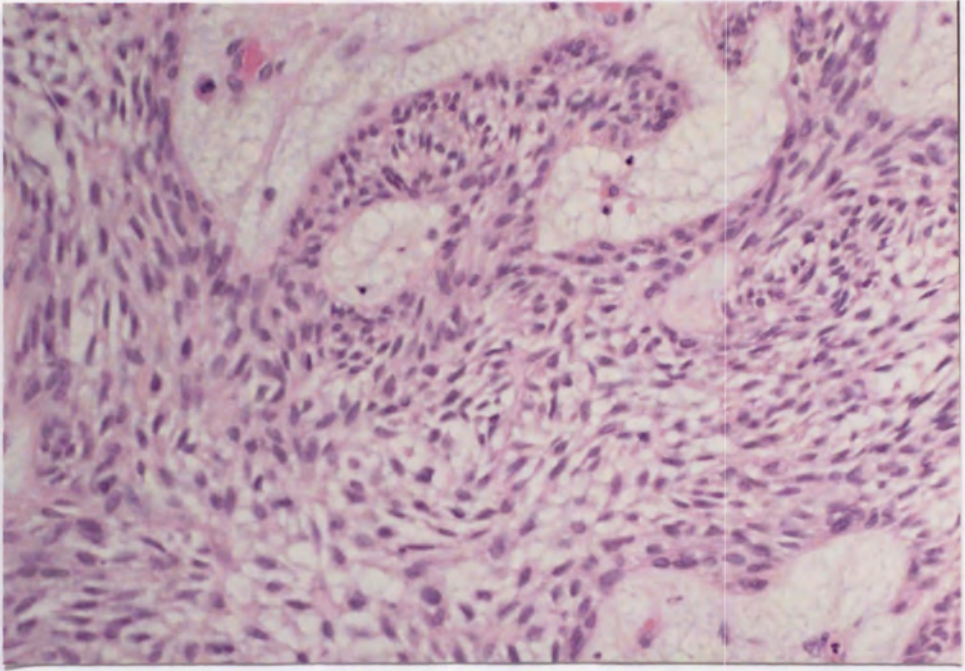


a. 濾胞型エナメル上皮腫：H-E 所見 (X250)

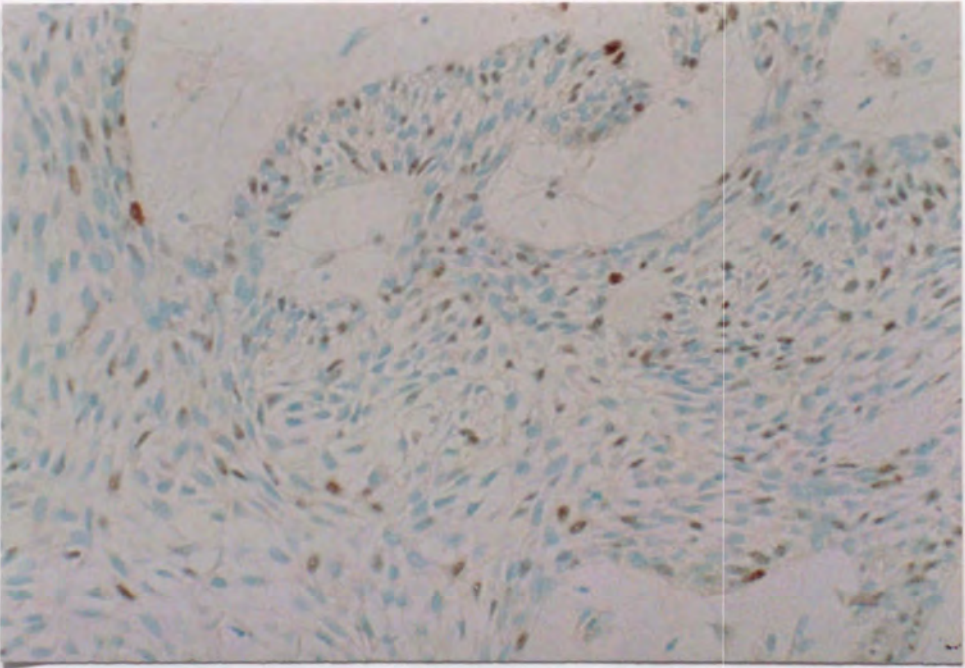


b. 濾胞型エナメル上皮腫：PCNA 染色所見  
PCNA 陽性細胞は，腫瘍胞巣辺縁部の円柱状細胞に多く分布する。 (X250)

写真2.

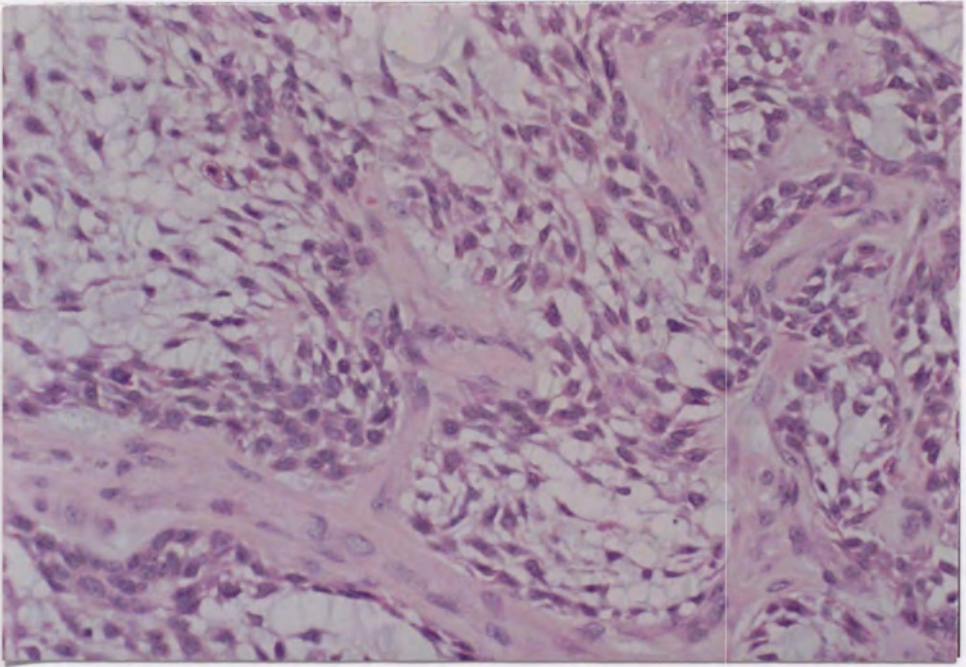


a. 叢状型エナメル上皮腫：H-E 所見 (X250)

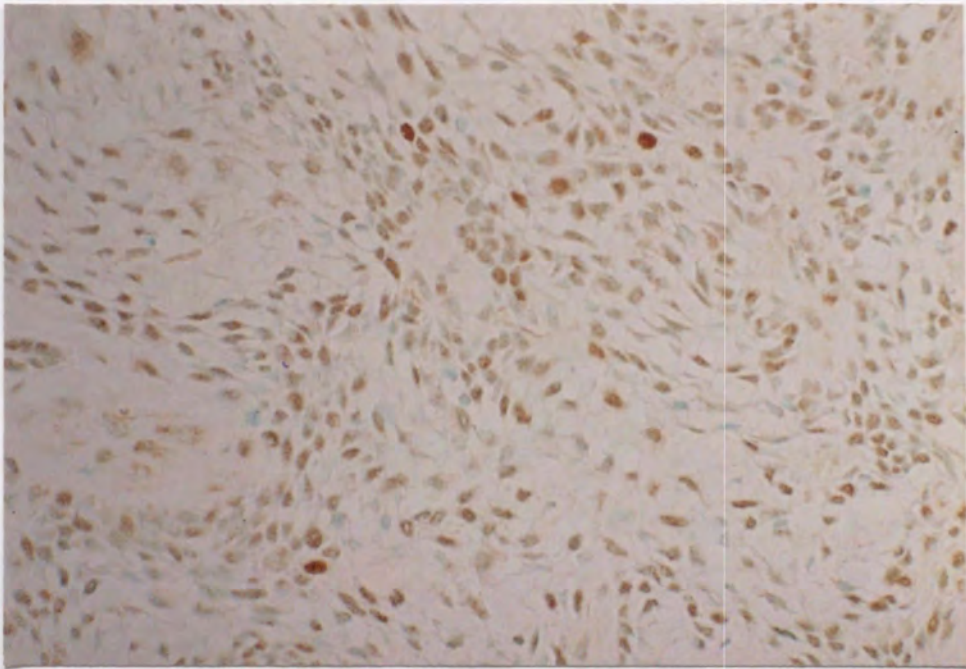


b. 叢状型エナメル上皮腫：PCNA 染色所見  
PCNA 陽性細胞は腫瘍実質全体に散在する。(X250)

写真3.

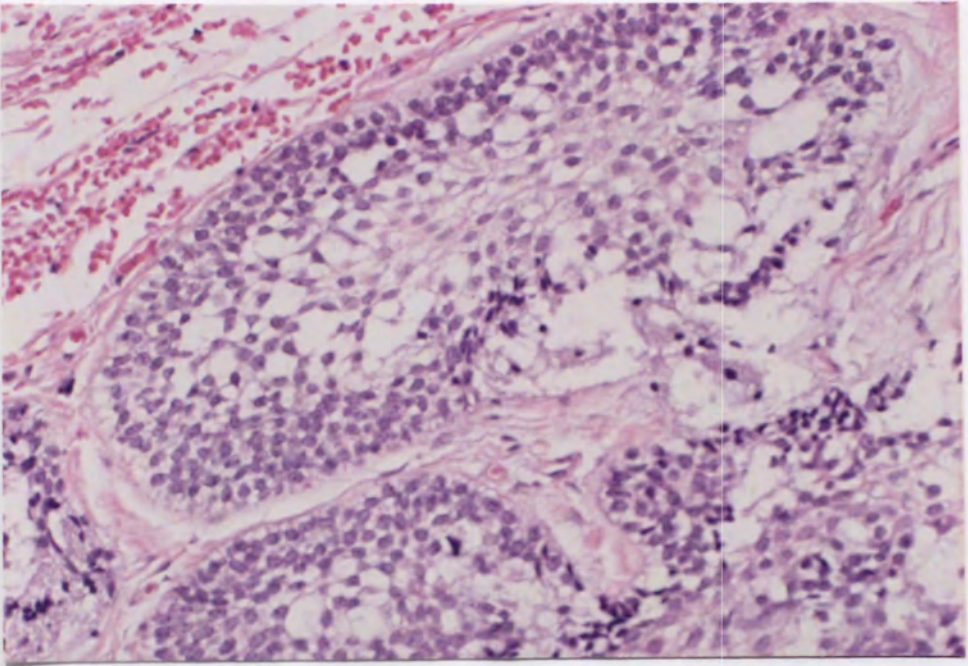


a. 叢状型エナメル上皮腫：PCNA 陽性率で高値を示した症例のH-E 所見 (X250)

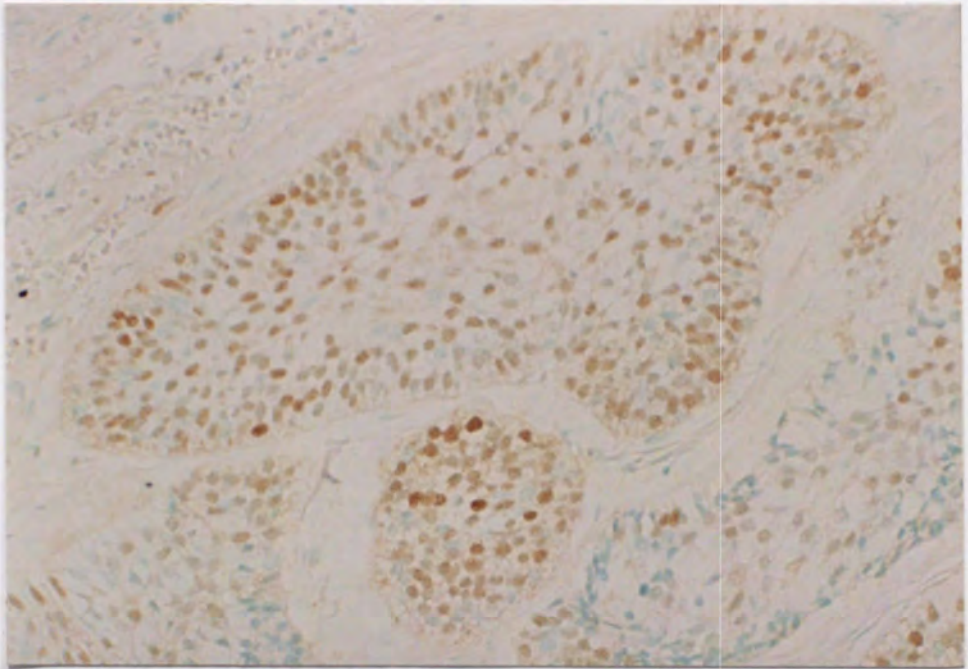


b. 叢状型エナメル上皮腫：PCNA 染色所見  
腫瘍実質全体にわたり多数の PCNA 陽性細胞を認める。( PCNA 陽性率：32.8% )  
(X250)

写真4.



a. エナメル上皮腫再発例：H-E 所見 (X250)



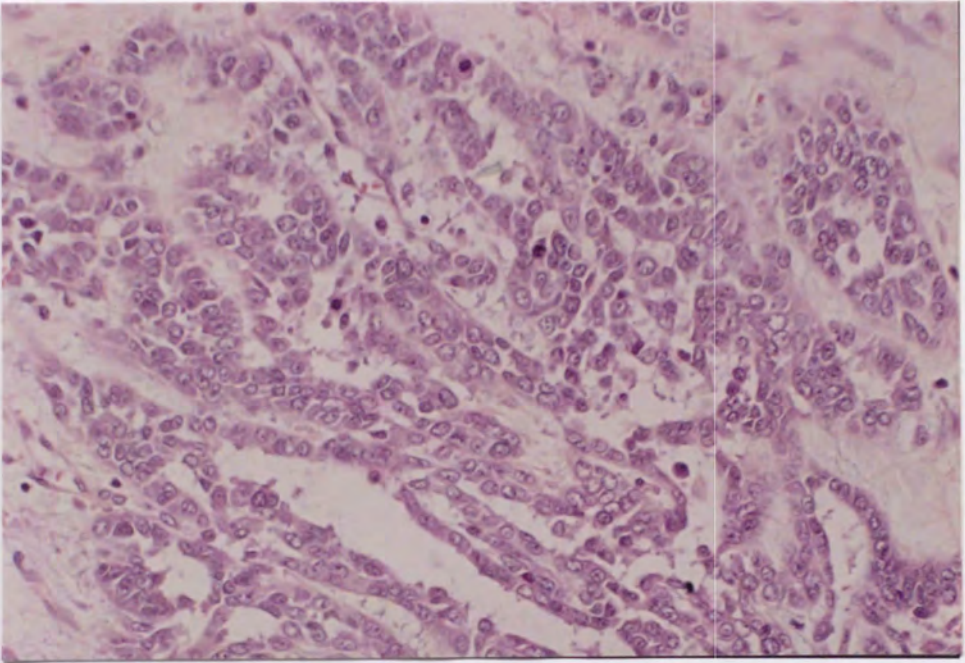
b. 濾胞型エナメル上皮腫再発例：PCNA 染色所見

PCNA 陽性細胞は、腫瘍胞巣辺縁部のみならず中央部細胞においても多く認められる。

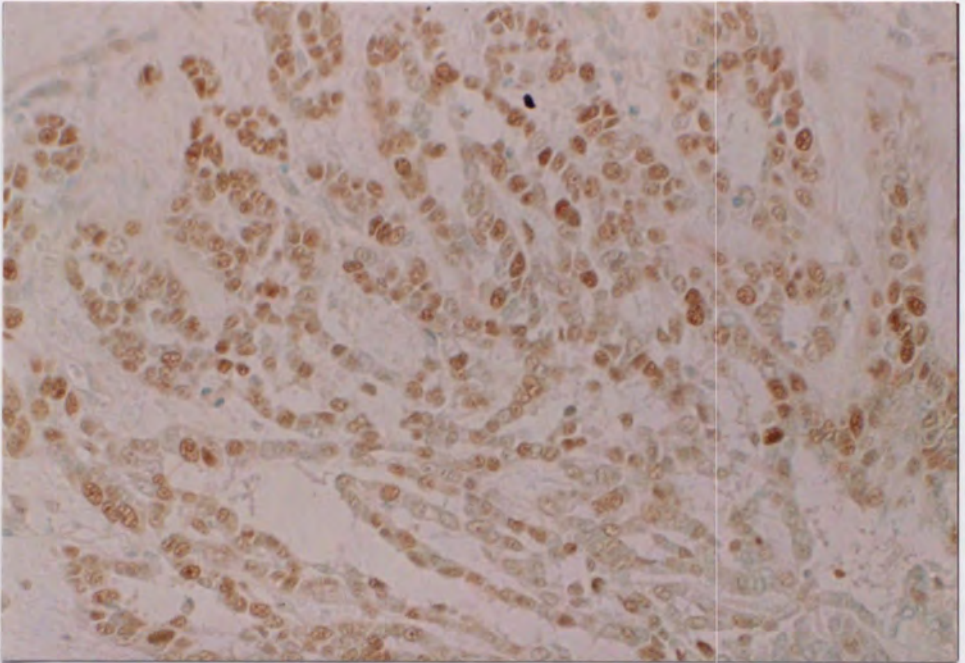
(X250)



写真5.



a. 悪性エナメル上皮腫：H-E 所見 (X250)

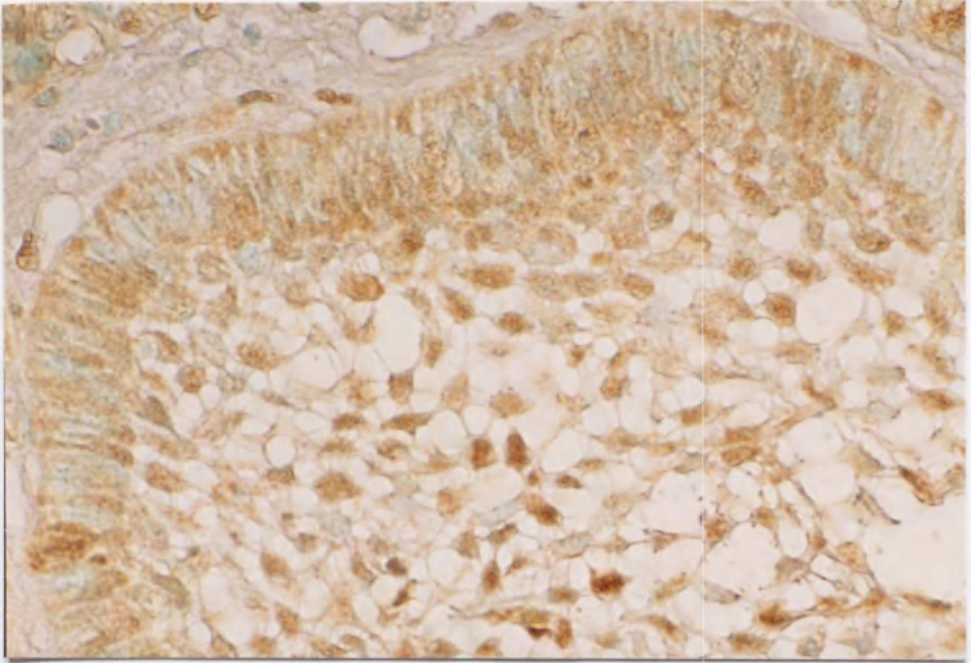


b. 悪性エナメル上皮腫：PCNA 染色所見

PCNA 陽性細胞は、腫瘍実質全体に分布し、エナメル上皮腫と比較して陽性細胞数の著明な増加を認める。

(X250)

写真6.

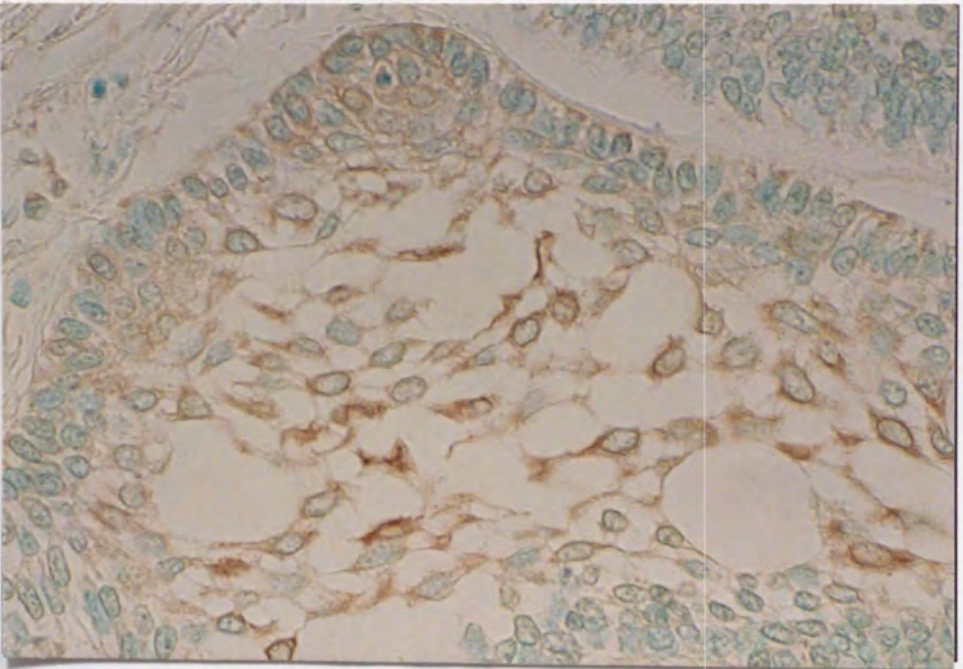


濾胞型エナメル上皮腫：c-myc 染色所見

腫瘍胞巣辺縁部細胞では核，核と細胞質，あるいは細胞質のみに，  
腫瘍胞巣中央部細胞では核内に陽性所見を認める。

(X500)

写真7.

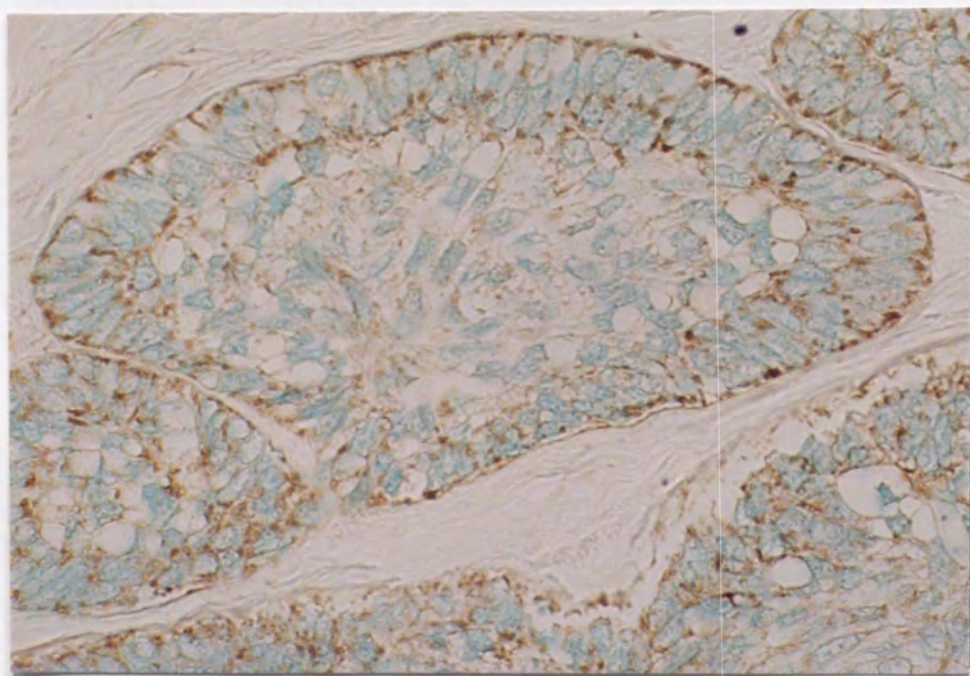


濾胞型エナメル上皮腫：ras 染色所見

腫瘍胞巣中央部細胞の細胞質に強陽性，胞巣辺縁部細胞では弱陽性  
を示す。

(X500)

写真8.

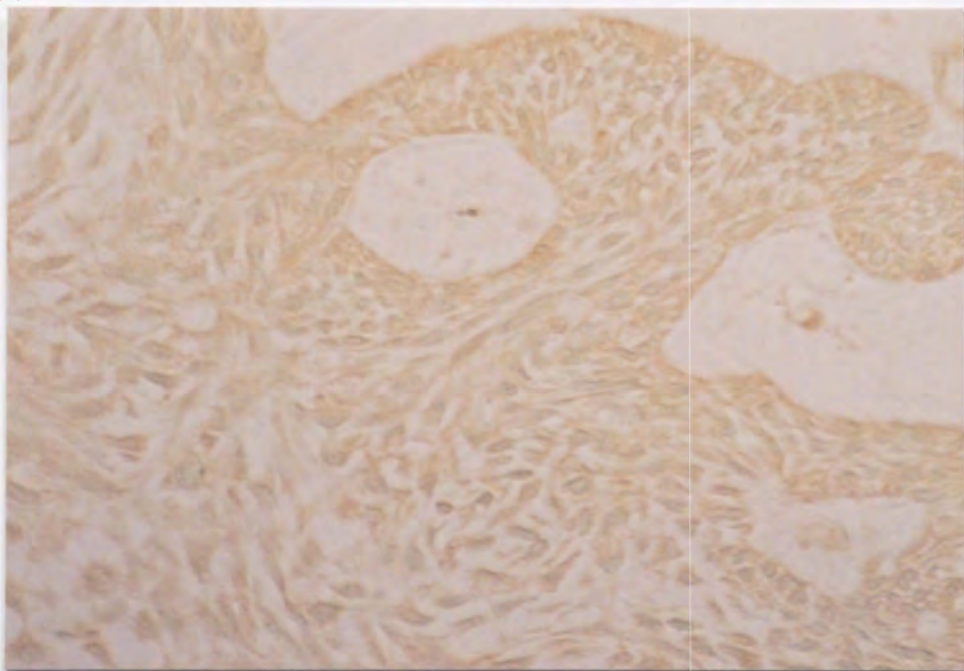


濾胞型エナメル上皮腫：c-erbB-2 染色所見

腫瘍胞巣辺縁部の円柱状細胞の細胞膜，細胞質で強陽性，胞巣中央部細胞では弱陽性～陰性を示す。

(X500)

写真9.

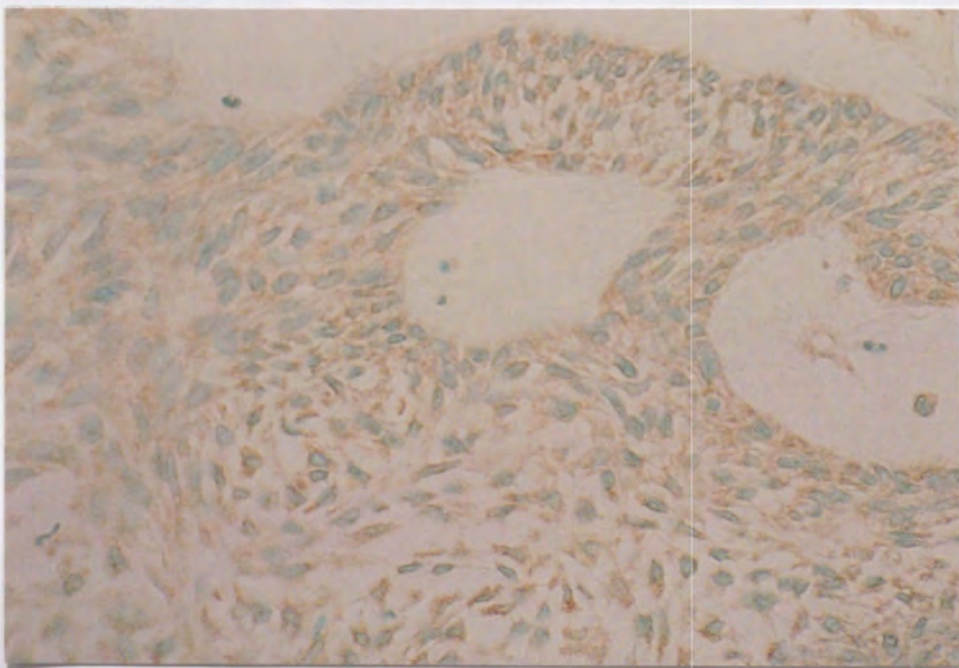


叢状型エナメル上皮腫：c-myc 染色所見

腫瘍実質全体にわたり，核と細胞質，あるいは細胞質のみに陽性所見を認める。

(X400)

写真10.

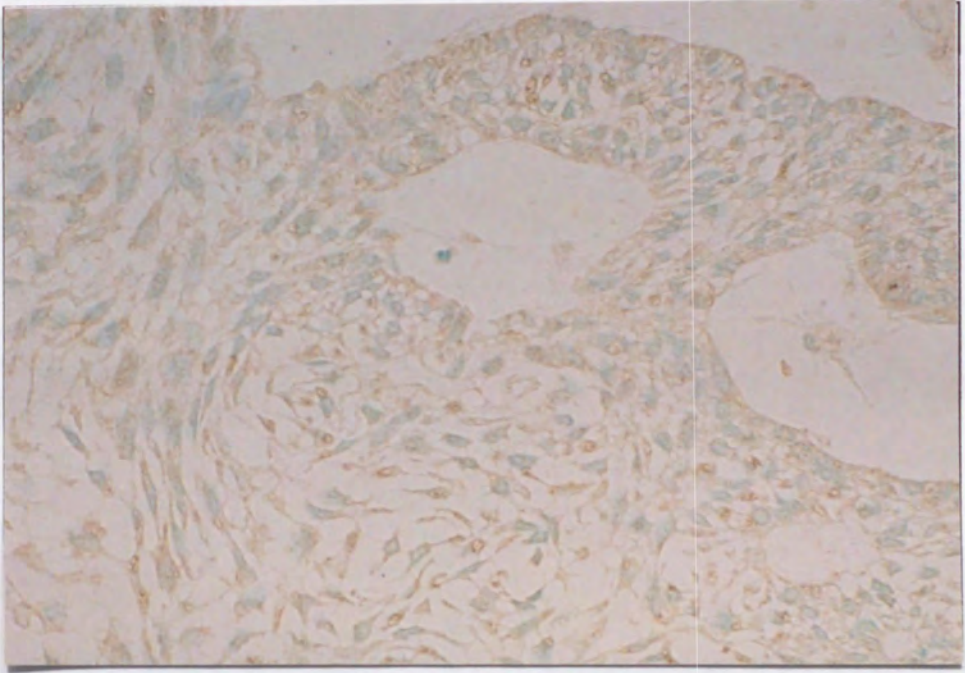


叢状型エナメル上皮腫：ras 染色所見

腫瘍実質全体にわたり，細胞質に弱陽性を示す。

(X400)

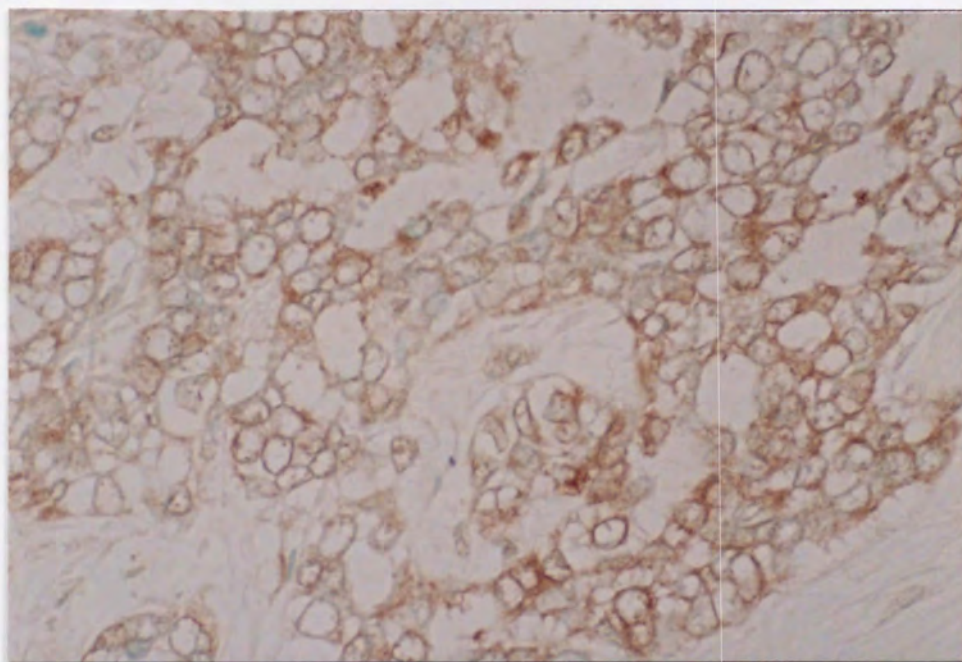
写真11.



叢状型エナメル上皮腫：c-erbB-2 染色所見

腫瘍実質全体にわたり，弱陽性～陰性を示す。(X250)

写真12.

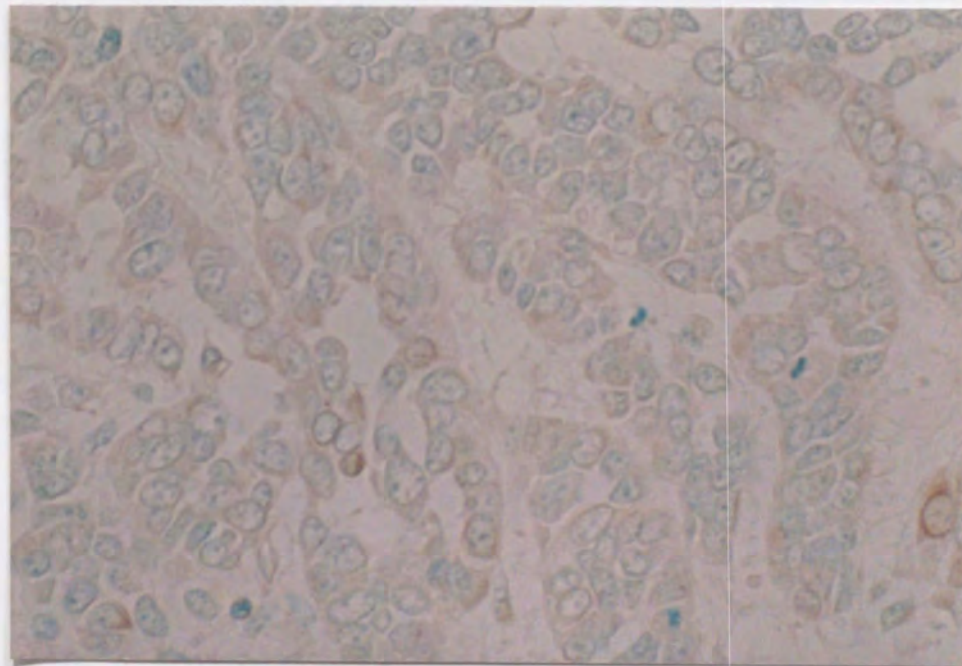


悪性エナメル上皮腫：c-myc 染色所見

腫瘍細胞核膜周囲の細胞質に強い陽性所見を示す。

(X500)

写真13.

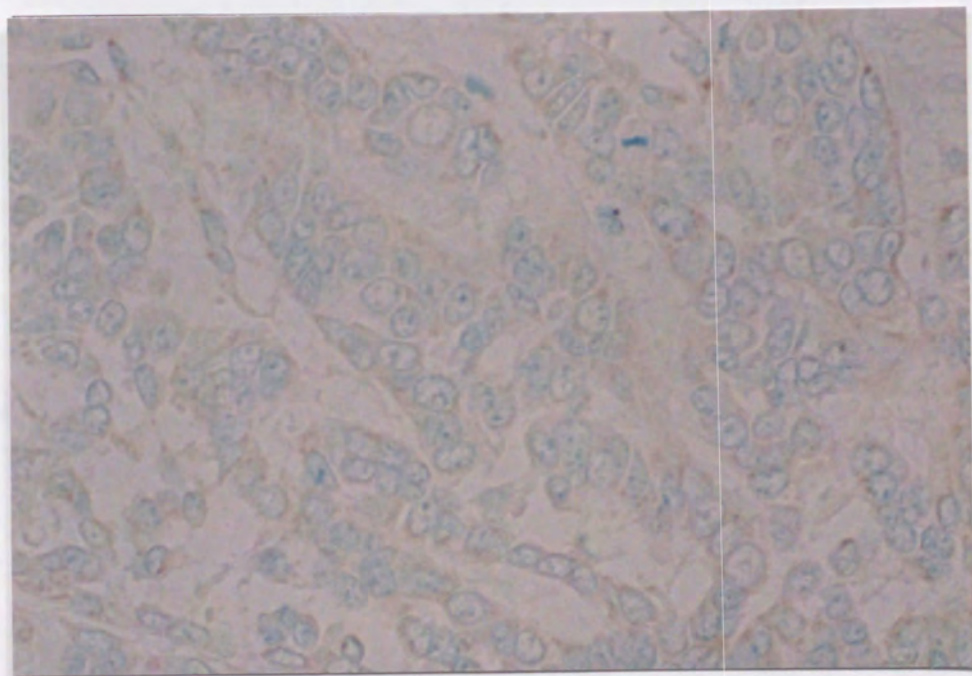


悪性エナメル上皮腫：ras 染色所見

一部の腫瘍細胞を除き陰性を示す。

(X500)

写真14.

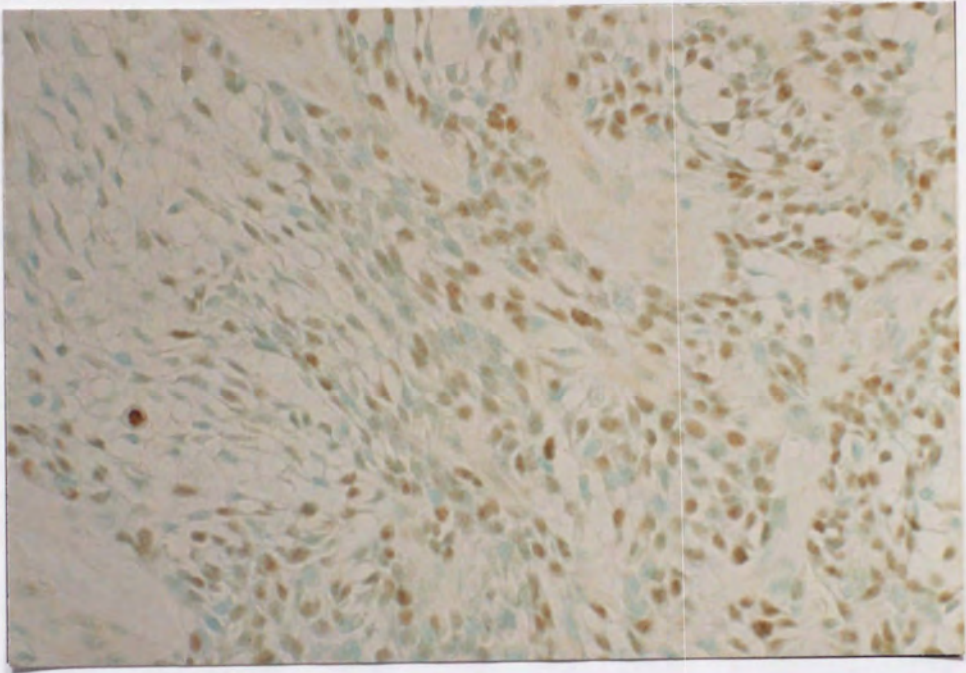


悪性エナメル上皮腫：c-erbB-2 染色所見

一部の腫瘍細胞を除き陰性を示す。

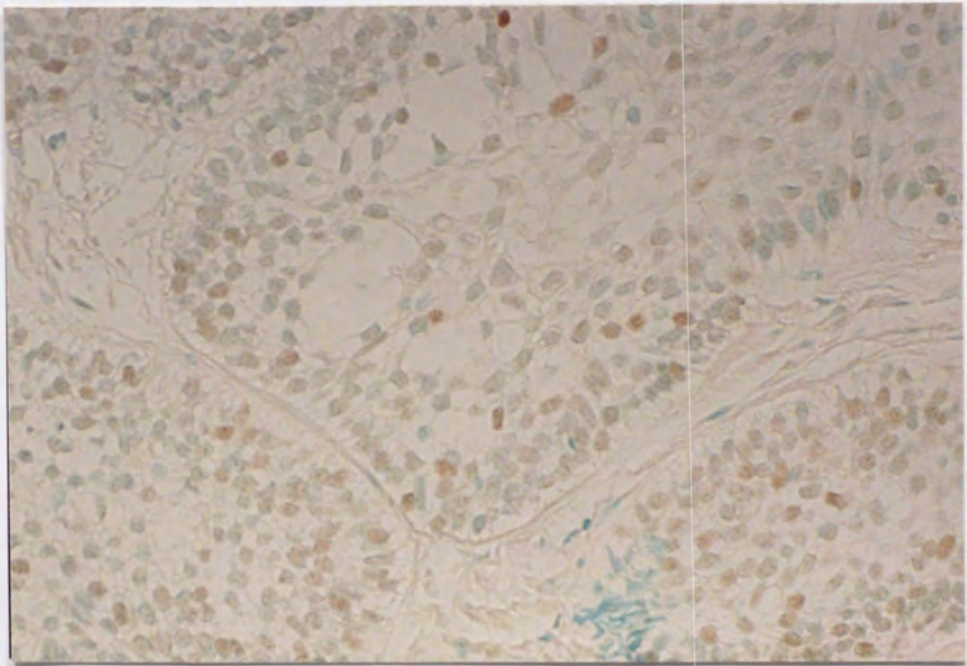
(X500)

写真15.



叢状型エナメル上皮腫：p53 染色所見 (X250)

写真16.



濾胞型エナメル上皮腫再発例：p53 染色所見 (X250)



写真17.



悪性エナメル上皮腫：p53 染色所見 (X250)

