

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者	篠 島 一 将		
論 文 審 査 委 員	(主 査)	朝日大学歯学部教授	村松 泰徳
	(副 査)	朝日大学歯学部教授	永山 元彦
	(副 査)	朝日大学歯学部教授	住友 伸一郎
論 文 題 目			
口腔粘膜細胞診で判定する上皮細胞の形態学的特徴を裏付ける細胞骨格分子			
<u>論文内容の要旨</u>			
【目 的】			
<p>口腔粘膜は、外因性の環境因子や内因性素因等の影響を受けさまざまな臨床像を示す。これらの病変の中には、初期の口腔癌や口腔潜在的悪性疾患等の腫瘍性変化を有する疾患が含まれ、病変を確定するには組織診が必要であるが、外科的侵襲を伴う欠点を持つ。一方、口腔粘膜細胞診は、生体に対して非侵襲性に実施できるという利点があり、通常 Papanicolaou 染色 (PAP 染色) による細胞や核の形態的变化を細胞異型として捉えているが、その判定には熟練した専門的知識を必要とし、これを裏付ける客観的判定基準の統一が求められている。そこで本研究では、口腔粘膜細胞診検体の PAP 染色でみられる細胞異型等の形態的变化を細胞骨格関連分子の変化で捉えて客観的判定基準に裏付けるために、腫瘍性変化に伴う Cytokeratin (CK) の局在変化, F-actin 微細構造と N/C 比の変化, F-actin と Cortactin の相互作用による細胞の浸潤能の変化, 腫瘍性変化の組織における Cortactin の発現強度について検索した。</p>			
【材料および方法】			
1. 患者標本			
<p>標本は、様々な口腔粘膜疾患の口腔細胞診実施時にブラシで採取し、細胞保存液 (PreservCyt®Solution, Hologic) に入れた液状化検体細胞診 (Liquid based cytology, LBC) 標本を供した。また、扁平上皮癌切除標本からブラシで擦過した LBC 標本も用いた。さらに、F-actin 観察のために、直接 10%ホルマリンで固定した LBC (Formalin Liquid based cytology, FLBC) 標本も用いた。組織標本は、扁平上皮癌と診断された症例及び組織診で健全な粘膜組織と確認できた症例を供した。</p>			
2. CK 免疫蛍光染色			
<p>LBC 検体で、Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy (NILM), Oral Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion (OLSIL), Oral High-grade Squamous Intraepithelial Lesion (OHSIL), Squamous Cell Carcinoma (SCC) と判定された診断後の LBC 検体残液を用いて、CK (AE1/AE3) に対する蛍光免疫染色と DAPI による核蛍光染色を行った。観察は共焦点レーザー顕微鏡を用い、画像構築を行った後、同標本からカバーガラスを剥がして同一の細胞に PAP 染色を施し、光学顕微鏡で観察した。</p>			

3. F-actin 蛍光染色と N/C 比

NILM および SCC と判定された FLBC 法検体を用いて、F-actin に対する蛍光染色と DAPI による核蛍光染色を行った。観察は共焦点レーザー顕微鏡で行い、三次元解析画像から N/C 比を計測し統計学的有意差検定を行った。

4. F-actin 蛍光染色と Cortactin 免疫蛍光染色

NILM および SCC と判定された FLBC 検体を用いて、F-actin と Cortactin に対する二重蛍光染色と DAPI による核蛍光染色を行った。観察は共焦点レーザー顕微鏡で行い、画像構築を行った後、同標本からカバーガラスを剥がして同一の細胞に PAP 染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

5. Cortactin 免疫組織染色

組織診で SCC と診断された標本と健常粘膜組織のパラフィン切片を用いて Cortactin に対する免疫染色を行い、ヘマトキシリンで対比染色して、光学顕微鏡で観察した。

【結 果】

1. 細胞質の CK や DAPI による核の蛍光強度は、腫瘍性変化に伴って上昇し、PAP 染色の細胞質オレンジ G 光輝性亢進やヘマトキシリン好性核腫大や核濃染にそれぞれ対応した変化を示した。
2. F-actin 微細構造は、NILM の上皮細胞は微絨毛様構造やハニカム様構造がみられ、SCC では糸状仮足や細胞外に突出した結節状変化として認めた。なお、共焦点レーザー顕微鏡による 3 次元的立体解析画像から算出した N/C 比は、NILM と比較して SCC で有意な上昇を示した。
3. F-actin と Cortactin の共発現は、異型を示す深層系細胞の浸潤突起に限局し、NILM や SCC の表層角化細胞や表層異型細胞には認めなかった。
4. Cortactin の発現は、正常な頬粘膜では有棘層および基底層に弱陽性像を認め、上皮性異形成の異形上皮では、中間層から基底層にかけて陽性像を認めた。SCC では 10 症例中 7 例で深部および浸潤癌胞巣の最外層細胞に強い発現を認めた。

【考 察】

共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞骨格の CK 免疫蛍光染色と PAP 染色の形態的観察の比較の結果から、細胞内部に存在する細胞骨格関連分子の存在量が腫瘍性変化の染色性や形態変化などの細胞像を反映している可能性が示唆された。細胞診保存液からホルマリンに固定条件を変更すると、細胞運動を F-actin 蛍光染色として観察することができ、さらに Cortactin 免疫蛍光染色との共発現から、浸潤能を有する腫瘍細胞を客観的に捉えることができると考えた。また組織標本における Cortactin の強い発現は浸潤深部の腫瘍細胞と一致し、腫瘍細胞の動態把握に有用であると考えた。

【結 論】

LBC 法を用いた口腔粘膜細胞診は、共焦点レーザー顕微鏡によって明らかとなる細胞骨格関連分子や蛍光標識された核の 3 次元構築画像から、PAP 染色の形態的所見の裏付けとなるだけでなく、客観的な細胞の所見を得ることができる。これらの追及はスクリーニングレベルでの細胞診を確定診断としての細胞診へと繋げる礎となり、細胞診判定の客観的指標を持った根拠として、腫瘍性変化の早期発見・早期治療に繋げることができる。