

原 著

液状化検体細胞診を用いたラット舌発がん実験における診断への応用

金子裕康¹⁾ 中尾寿奈²⁾ 江原道子²⁾
永山元彦²⁾ 住友伸一郎¹⁾

Application of liquid-based cytology in diagnosis of oral precancerous lesion

KANEKO HIROYASU¹⁾, NAKAO JUNA²⁾, EHARA MICHIKO²⁾,
NAGAYAMA MOTOHIKO²⁾, SUMITOMO SINICHIRO¹⁾

口腔粘膜の細胞診は従来ブラシ等で粘膜の病巣を擦過し、そのままスライドグラスに塗抹し、その後、アルコール等で固定あるいは風乾する方法、いわゆる従来法で行われていた¹⁾。この従来法では1回の検体収量が少なく、基本的なPapanicolaou染色(PAP染色)とMay-Giemsa染色の2種類程度の検索しか行うことができなかった。また、細胞がスライドグラスの一部に密集してしまうことも多く、塗抹後の標本の乾燥や固定不足等の問題も回避できないものであった。これらの、従来法細胞診における問題点を解決するために、近年、採取に用いたブラシ等から直接専用の固定液に細胞を浮遊させ固定し、その後、専用の装置を用いスライドグラスに均一に塗抹する液状化検体細胞診(liquid-based cytology, LBC)が導入されつつある²⁾。

これまで坂野ら³⁾は4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)を用いたラット舌発がん実験により、heterogeneous nuclear ribonucleic protein K (hnRNP K)の検索を行ってきた。hnRNP Kは、ラット第17番染色体に含まれるがん関連遺伝子の1つであるRNA結合タンパクhnRNPファミリーの1つで、主にmRNAと結合してmRNAの核外輸送、転写、翻訳および修飾に関与している^{4, 5)}。ラット舌がんにおける正常の粘膜組織と比較したmRNA発現検討でhnRNP KmRNAはTP53mRNAに比較して上皮性異形成において有意にタンパクの高発現がみられ、hnRNP Kは前がん病変の診断マーカーとして組織学的に有用であると報告されている³⁾。

今回、ラット舌発がんモデルを用いて細胞診と組織診を比較し診断の精度について検討し、さらにhnRNP Kとp53の免疫組織化学的染色や、mRNA発現量比較検討への応用による診断精度向上の可能性についても検討した。

キーワード：擦過細胞診、液状化検体細胞診、口腔がん、hnRNP K、p53

Oral cytology has been performed mainly by using the conventional method, in which the lesion of the mucosa is scraped, e.g., with a brush, and then the collected cells are smeared on a slide glass. Subsequently, the slide is fixed with alcohol or air dry.¹⁾ However, in this method, a limited amount of cells can be obtained at one time, and only Papanicolaou and May-Giemsa staining can be used for examination. Also, obtained cells are more likely to overlap on the slide glass, and other inevitable problems include drying of the specimen and insufficient fixation. Liquid-based cytology (LBC) can be performed without these disadvantages; therefore, it has become widely used recently. In this method, cells are collected, e.g., with a brush, and it is placed directly into a fixing solution. Then the cells can be evenly smeared on the slide glass in a laboratory. Sakano et al.³⁾ have searched for heterogeneous nuclear ribonucleic protein K (hnRNP

¹⁾ 朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔外科学分野
〒501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

²⁾ 朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔病理学分野
〒501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

¹⁾ Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control, Asahi University School of

Dentistry

Hozumi 1851, Mizuho-City, Gifu 501-0296, Japan

²⁾ Department of Oral Pathology, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control, Asahi University School of Dentistry

Hozumi 1851, Mizuho-City, Gifu 501-0296, Japan

(2021年1月22日受理)

K) in a 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) -induced rat tongue carcinogenesis. hnRNP K is a member of the hnRNP family, an RNA-binding protein of a cancer-related genes located on rat chromosome 17. This protein mainly binds to mRNA and is involved in nuclear transport, transcription, translation and modification of mRNA.^{4, 5} In a study of mRNA expression between normal mucosa and cancer lesion in rat carcinogenesis model, in epithelial dysplasia, protein expression of hnRNP K mRNA was significantly higher than that of TP53 and hnRNP K, indicating that hnRNP K was histologically useful as a diagnostic marker for precancerous lesions³ Here, we investigated diagnostic accuracy between cytology and histology in rat carcinogenesis models and the possibility of the improvement of diagnostic accuracy of LBC by using immunohistochemistry of hnRNP K and p53 and analysis of mRNA expression level of these genes.

Key words : scraping cytology, liquid-based cytology, oral cancer, hnRNP K, p53

材料および方法

1 ラットの発がん実験

(1) 発がんモデル動物の作製

6週齢の雄 Dark-Agouti ラット 36匹に 0.001% に希釈した発がん剤 4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) (和光純薬, 大阪) を 180 日間経口投与した³⁾. 2匹はコントロール群として水を摂取させる通常飼育を同期間行った. 発がん剤投与期間中に急激な体重変化が見られた場合や, または肉眼的に舌粘膜表面にびらんあるいは潰瘍が確認された場合には, その時点で屠殺し舌の摘出を行い, それ以外は 180 日後に屠殺し, 舌の摘出を行った. なお, 本研究は朝日大学実験動物倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号 15-002).

(2) ラットの口腔細胞診

発がん実験を開始した 70 日目以降から 14 日間隔で 180 日まで, ラットの口腔粘膜をエンドサーベックス ブラシ-S (日本 BD 社, 東京) を用いて, 擦過し細胞を採取した. このブラシを SurePath™ Collection Vial (Becton Dickinson, NJ, USA) に浸漬し, ブラシに付着した採取細胞を Vial 中に遊離させた. 以下の手順に従って SurePath™ (Becton Dickinson, NJ, USA) 標本を作製した.

- 1) 前準備: BDSurePath™ プレコートスライド (プレコートスライド), BD™ 遠心チューブ (遠心チューブ) に検体番号を記入した .BD プレップステイン™ スライドラック J (スライドラック) にプレコートスライド, BD™ セトリングチャンバー (セトリングチャンバー) を取り付けた.
- 2) 遠心分離 (1 回目): 200 × g 2 分遠心した. 必要な細胞が下層へ, 遮蔽物が上清へ分離した.
- 3) 上清をデカント: 上清をデカントして除去した.

遠心チューブ上部の余分な水分は濾紙で除去した.

- 4) 遠心分離 (2 回目): 800 × g 10 分遠心した.
- 5) 上清をデカント: 上清をデカントして除去した. 遠心チューブ上部の余分な水分は濾紙で除去した.
- 6) 攪拌: 沈渣に精製水 1ml を加え, ボルテックスにて攪拌した.
- 7) 塗抹: ピペットで 200μl を採取し, セットしておいたセトリングチャンバー内へ分注し 15 分間放置した.
- 8) 洗浄: スライドラックを逆転させ過剰な水分を除去し, さらに濾紙で除去した. セトリングチャンバーの内壁に沿わせて 100% エタノールを 0.5ml 入れ, エタノールですすぐようにスライドラックを揺り動かして洗浄した. さらに逆転させ, 洗浄したエタノールを捨てた. (この操作を 2 回繰り返した).
- 9) 固定: スライドラックを逆転させたまま 20 秒間, 濾紙の上に置いた. その後セトリングチャンバーを取り外し, 塗抹面が乾燥しないうちに 95% エタノールへ浸漬した.

2 染色と診断

口腔細胞診はベセスダシステムを応用した口腔診断の診断基準に基づいて診断した¹⁴⁾. そのフローチャートを図 1 に示す.

正常および反応性あるいは上皮内病変や悪性腫瘍性変化がないもの (negative for intraepithelial lesion or malignancy) を NILM, 低異型度上皮内腫瘍性病変あるいは上皮性異形成相当 (low-grade squamous intraepithelial lesion or low-grade dysplasia) を LSIL, 高異型度上皮内腫瘍性病変あるいは上皮性異形成相当 (high-grade squamous intraepithelial lesion or high-grade dysplasia) を HSIL, 扁平上皮

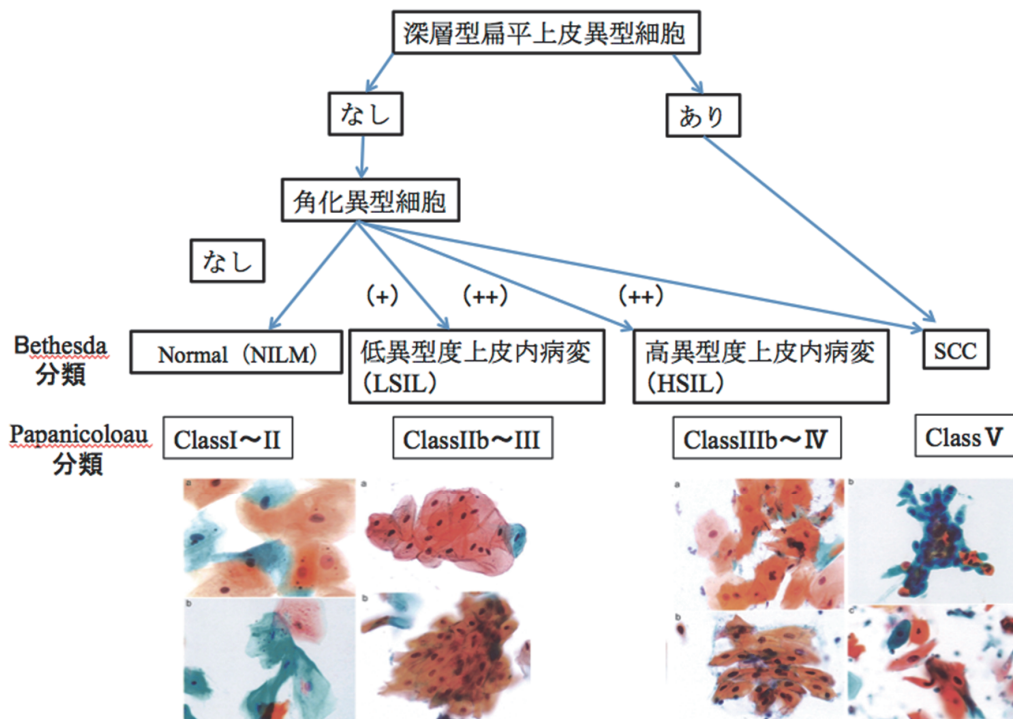


図1 ベセスダシステムにおける口腔細胞診の基準

癌 (squamous cell carcinoma) を SCC と示す。

(1) Papanicolaou 染色

- 1) 95% エタノール固定された標本を水道水にて5分間水洗した。
- 2) 蒸留水 (MiliQ) に10秒間浸漬した。
- 3) Gill's Hematoxylin V (武藤化学, 東京) を2倍希釈したものに2分間浸漬し核染を行った。
- 4) 水道水にて5分間水洗した。
- 5) 0.002% 塩酸・70% アルコールに3秒浸漬した。
- 6) 水道水にて5分間水洗した。
- 7) 蒸留水 (MilliQ) に10秒間浸漬した。
- 8) 80% アルコールに5秒間浸漬した。
- 9) 95% アルコールに5秒間浸漬した (3回)。
- 10) OG-6 (武藤化学, 東京) に8分間浸漬した。
- 11) 95% アルコールに5秒間浸漬した (3回)。
- 12) EA-50 (武藤化学, 東京) に16分間浸漬した。
- 13) 95% アルコールに5秒間浸漬した。
- 14) 無水アルコールに5秒間浸漬した (3回)。
- 15) 無水アルコールに5分間浸漬した (3回)。
- 16) キシレンに5分間浸漬した (3回)。
- 17) Mount-Quick (大同産業, 東京) で封入した。

(2) 組織学的判定

薄切したラット舌組織に HE 染色を施し, WHO 上皮性異形成診断基準 (2017) をもとに病理組織学的に診断した。16 項目中に該当する所見が4項目以上8項目以下であったものを Mild epithelial dysplasia, 9項目以上13項目以下であったものを Moderate epithelial dysplasia, および14項目以上であったものを Severe epithelial dysplasia とした。基底膜を超えて間質側に浸潤したものを SCC とした。コントロールとして通常飼育を行ったものを Normal とした。さらに, 屠殺時の細胞診の結果と, 組織診の結果を比較検討した。以下に HE 染色の方法を示す。

- 1) 脱パラフィン後, 水道水にて水洗した。
- 2) 蒸留水 (MilliQ) に10秒間浸漬した。
- 3) ヘマトキシリンにて核染色を6分間行った。
- 4) 水道水にて10分間水洗した。
- 5) エオジンにて細胞質染色を3分間行った。
- 6) 70% アルコールに5秒間浸漬した。
- 7) 90% アルコールに5秒間浸漬した。
- 8) 100% アルコールに5秒間浸漬した (3回)。
- 9) キシレンに5分間浸漬した (3回)。
- 10) Mount-Quick (大同産業, 東京) で封入した。

- (3) 免疫染色
 - 1) 5分間水道水にて水洗した。
 - 2) 3%過酸化水素水・メタノールに20分間浸漬し、内因性ペルオキシターゼ活性阻害した。
 - 3) 5分間水道水にて水洗した。
 - 4) 抗原賦活処理 (citrate heat, EDTA heat) を150秒間行った後、15分間自然冷却した。
 - 5) 0.14M NaCl含0.01M phosphate buffer saline (PBS) に15分間浸漬した。
 - 6) BSA (1% Alb+PBS) でブロッキングを30分間行った。
 - 7) PBS に15分間浸漬した。
 - 8) PBS で希釈した一次抗体 (hnRNP K, p53) を30分室温で反応させた。なお使用した一次抗体は表1に示すものを使用した。
 - 9) PBS で60分浸漬した (3回)。
 - 10) 二次抗体シンプルステイン MAX-PO (M) (Nichirei Bioscience, Tokyo) を30分間室温で反応させた。
 - 11) PBS で30分浸漬した (3回)。
 - 12) 発色基質 3,3-Diaminobenzidine (DAB) (Dako, Glostrup, Denmark) で6分間室温反応させた。
 - 13) 5分間水道水にて水洗した。
 - 14) 核対比染色はヘマトキシリンで6分間行った。
 - 15) 5分間水道水にて水洗した。
 - 16) 100% アルコールにて脱水した。
 - 17) Mount-Quick (大同産業, 東京) で封入した。
 - 18) hnRNP K および p53 による細胞診の判定基準は、ラベリングインデックス (LI) を用いた。hnRNP K は核が染色されていないものを NILM, 50%以下の核染色率を LSIL, 60~80%を HSIL, 90%以上を SCC とした。

3 遺伝子解析

(1) 細胞診検体からの RNA 抽出

SurePath vial 中に保存されたラット舌粘膜細胞より ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega, WI, USA) を用いて RNA の抽出を行った。正常群 1 例, NILM 1 例, LSIL 2 例, HSIL 2 例, SCC 1 例をサンプルとした。

表 1 ラット口腔細胞診の免疫染色用 1 次抗体

Antibody	Clone	Antigen retrieval	Dilution	Company
hnRNP K	EP943Y	Citrate	1:200	Abcam, Cambridge, UK
p53	PAb 240	EDTA	1:400	Abcam, Cambridge, UK

- 1) 1.5ml チューブにバイアル中のサンプル液を 1ml 入れて 500 × g 5 分遠心した。
- 2) 下層に沈殿した細胞沈渣を確認し上清を取り除き、滅菌済みの冷却した 1 × PBS で洗浄し、300 × g 5 分間遠心した。
- 3) BL+TG Buffer 250μl とイソプロパノール 85μl を加えたのち攪拌した。
- 4) Collection Tube にミニカラムをセットして 3) をサンプルに加えて、14,000 × g 30 秒間遠心した。
- 5) RNA Wash Solution を 500μl 加えて 14,000 × g 30 秒間遠心した。DNase Incubation Mix (Yellow Core Buffer+MnCl₂0.09M+DNaseI) を 30μl 加えて室温で 15 分間反応させた。200μl の Column Wash Solution をミニカラムに加えて 14,000 × g 30 秒間遠心した。さらに 500μl の RNA Wash Solution を加えて 14,000 × g 30 秒間遠心した。
- 6) ミニカラムを新しい Collection Tube に移し替えて、300μl の RNA Wash Solution を加えて、13,000 × g 30 秒間遠心した。
- 7) ミニカラムを Elution Tube 移し、Nuclease-Free Water を 30μl 加えて 13,000 × g 1 分間遠心した。

(2) 細胞診検体における RNA 解析

抽出した total RNA は NanoDrop2000 (Thermo, Wilmington, USA) で濃度測定を行い、光学的に 260nm と 280nm の吸光度の比が 1.7 以上であることを確認した。

(3) RT-PCR 法による mRNA 発現量の解析

抽出した Total RNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) を用いて、逆転写反応を 25℃ 10 分間, 37℃ 120 分間行った後、85℃ 5 分間で酵素失活反応を行い cDNA の合成を行った。

TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA), TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies, Carlsbad, USA) および得られた cDNA を用いて Applied Biosystems StepOne™ Real time PCR systems (Life Technologies, Carlsbad, USA) の ΔΔCt 法による相対定量的リアルタイム PCR 解析を行った。なお TaqMan Gene Expression Assays は表 2 に示したプライマーを使用した。RT-PCR 用のプレートデザイン例を表 3 に示す。

6 統計解析

各解析後のデータ間において Student *t* 検定を行

表2 TaqMan Gene Expression Assay リスト

Assay type	Gene symbol	Assay ID
Target	<i>hnRNP K</i>	Rn00470532_g1
Target	<i>TP53</i>	Rn00755717_m1
Endogenous	<i>18s</i>	Rn03928990_g1

表3 RT-PCR用のプレートデザイン例

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	18s DW	18s Control	18s NILM1	18s LSIL1	18s LSIL2	18s HSIL1	18s HSIL2	18s SCC1
2	18s DW	18s Control	18s NILM1	18s LSIL1	18s LSIL2	18s HSIL1	18s HSIL2	18s SCC1
3	18s DW	18s Control	18s NILM1	18s LSIL1	18s LSIL2	18s HSIL1	18s HSIL2	18s SCC1
4	hnRNPK DW	hnRNPK Control	hnRNPK NILM1	hnRNPK LSIL1	hnRNPK LSIL2	hnRNPK HSIL1	hnRNPK HSIL2	hnRNPK SCC1
5	hnRNPK DW	hnRNPK Control	hnRNPK NILM1	hnRNPK LSIL1	hnRNPK LSIL2	hnRNPK HSIL1	hnRNPK HSIL2	hnRNPK SCC1
6	hnRNPK DW	hnRNPK Control	hnRNPK NILM1	hnRNPK LSIL1	hnRNPK LSIL2	hnRNPK HSIL1	hnRNPK HSIL2	hnRNPK SCC1

い、 $p < 0.01$ および $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

結果

1 ラットの発がん実験

(1) 肉眼所見 (図2)

対照群は正常な舌粘膜であるが、発がん剤投与群では舌の中央から後方の舌背粘膜に腫瘤および潰瘍といった粘膜の変化が認められた。

(2) 舌組織の HE 染色による組織学的分類 (図3)

Mild epithelial dysplasia は 4 例 Moderate epithelial

dysplasia は 5 例, Severe epithelial dysplasia は認められず, SCC は 25 例であった。コントロールとして通常飼育を行ったもの 2 例は Normal とした。

2 各種染色実験

(1) ラットの細胞診の細胞像

実験開始後 70 日目には NILM は 6 例, LSIL は 12 例, HSIL は 9 例, SCC は 9 例であった。84 日目には NILM は 4 例, LSIL は 11 例, HSIL は 8 例, SCC は 13 例であった。98 日目には NILM は 3 例, LSIL は 6 例, HSIL は 7 例, SCC は 20 例であった。屠殺時 120



図2 発がん実験ラット舌組織の肉眼写真

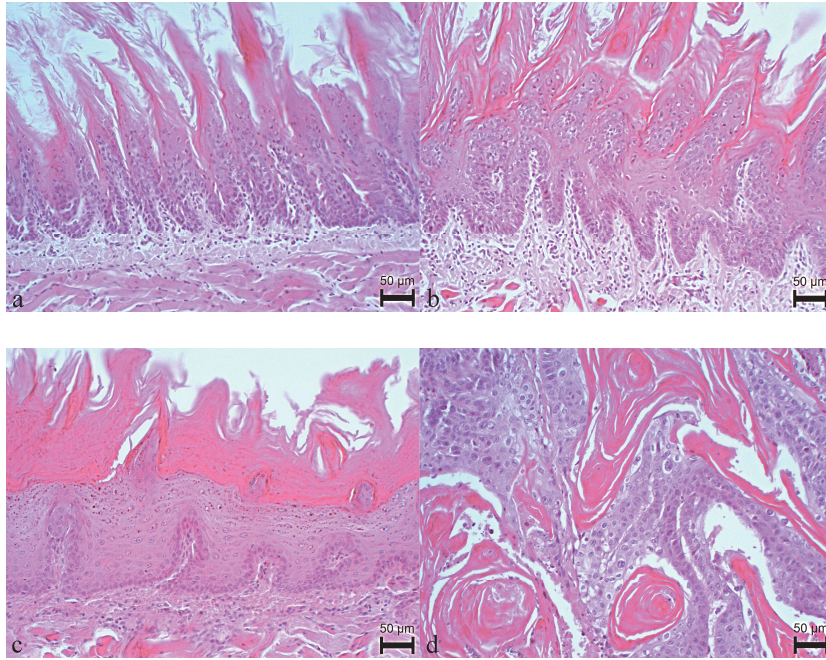


図3 発がん実験によるラットの病理組織像

(a : Normal, b : Mild epithelial dysplasia, c : Moderate epithelial dysplasia, d : SCC)

日目の擦過細胞診において、NILMは2例、LSILは1例、HSILは7例、SCCは26例であった。

細胞像において、NILMはケラトヒアリン顆粒を含むオレンジG好染・ライトグリーン好染の表層細胞を認め、核や細胞の大きさは均一であった(図4)。LSILは軽度の光輝性を有する細胞質を持った表層角化細胞と細胞異型を認めた(図5)。HSILは角化細胞集団の核に多様性を認めた(図6)。SCCは深層型異型細胞集団を多数認めた(図7)。

さらに屠殺時の細胞診と組織診での対応を検討した。細胞診でNILMと判定された2例すべてが組織

診でNormalは2例であった。細胞診でLSILと判定された1例は組織診でMild epithelial dysplasiaであった。細胞診でHSILと判定された7例のうち組織診でModerate epithelial dysplasiaは4例であった。細胞診でSCCと判定され3例は組織診で、すべてSCCであった(表4)。

(2) ラットの免疫染色

hnRNP Kの免疫染色による判定では、NILMは表層細胞の細胞質に強陽性(図8)、LSILは表層細胞の細胞質と核に陽性(図9)、HSILとSCCは角化型異

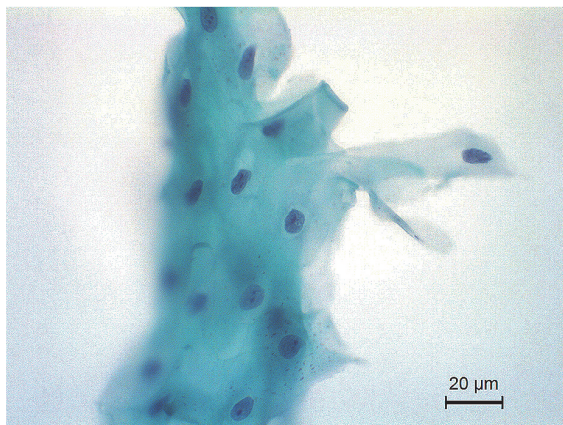


図4 NILM (PAP染色)

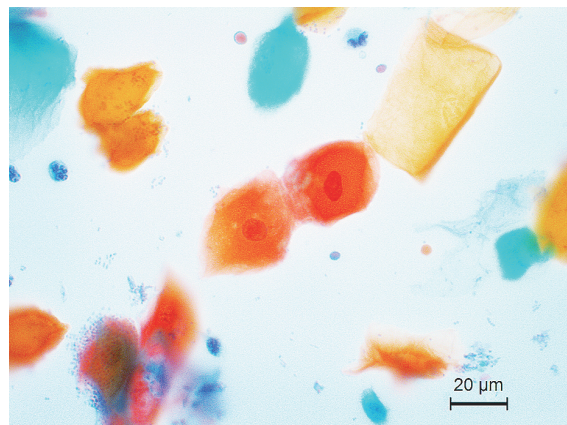


図5 LSIL (PAP染色)

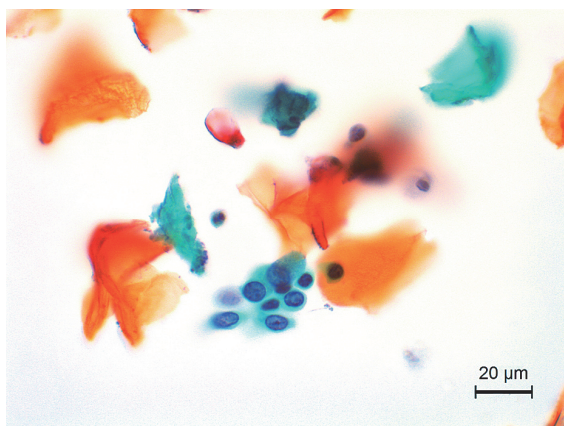


図6 HSIL (PAP 染色)

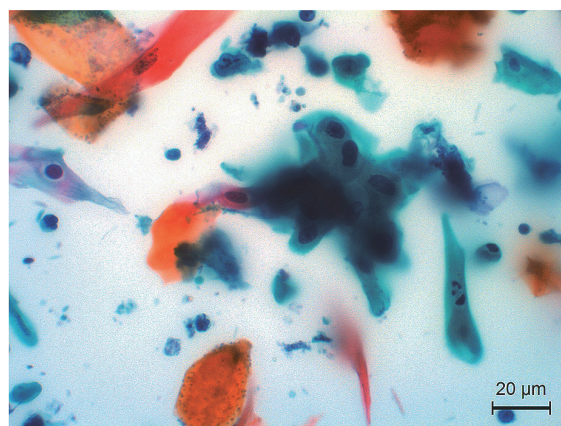


図7 SCC (PAP 染色)

表4 組織診と細胞診の診断の対応

組織診\細胞診	NILM	LSIL	HSIL	SCC
Normal	2	0	0	0
Mild	0	1	0	0
Moderate	0	0	4	0
Severe	0	0	0	0
SCC	0	0	3	26

型細胞と深層型異型細胞の核に強陽性を示した（図9, 10）。なお、HSILと判定したもののうち、組織診でModerate epithelial dysplasiaに分類されたものは細胞質への陽性を認めしたが、SCCに分類されたものでは細胞質へ陽性は認められなかった（図11）。p53の免疫染色では、PAP染色で判定したものの、NILMで陰性、LSILではごく少数の核に陽性であり、HSILでLIは30%（図12）、SCCでLIは70%（図13）であった。

3 細胞診からの mRNA 発現量の解析

(1) 相対定量的リアルタイムPCR解析

Normalで発現した*hnRNP K*のNILMにおけるmRNA量を1とした場合、LSILでは2.44倍、HSILでは6.26倍、SCCでは8.83倍の発現量を示した（図14）。またNormalで発現した*TP53*のNILMにおけるmRNA量を1とした場合、LSILでは0.86倍、HSILでは1.58倍、SCCでは8.15倍の発現量を示した（図15）。

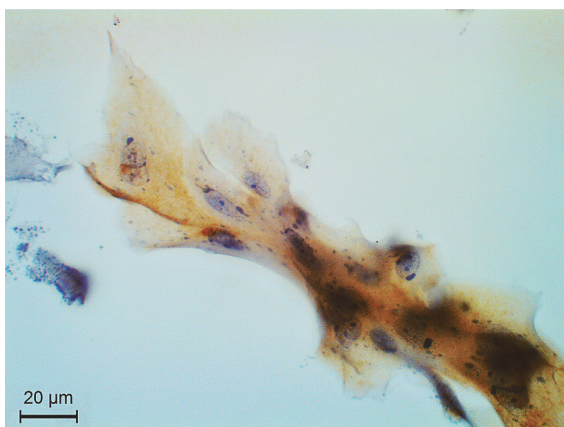


図8 NILM (hnRNP K)



図9 LSIL (hnRNP K)

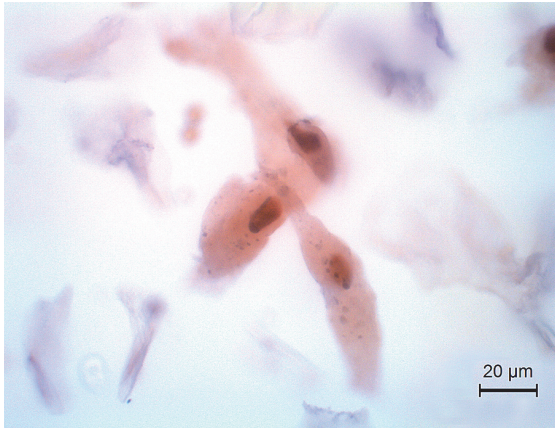


図 10 HSIL (hnRNP K)

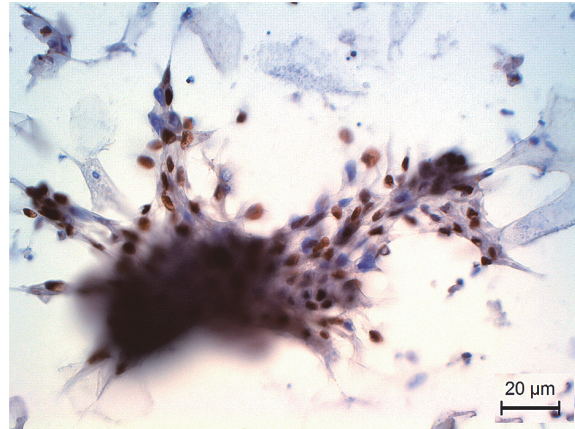


図 11 SCC (hnRNP K)

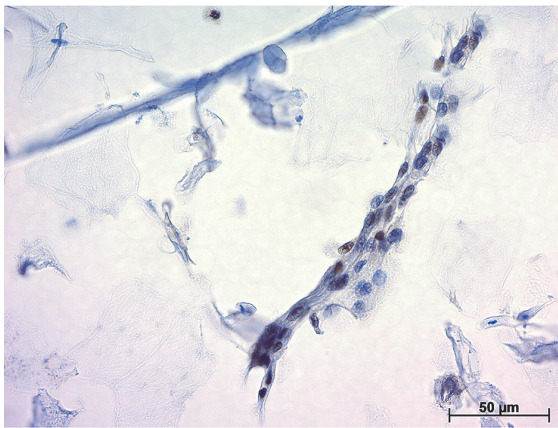


図 12 HSIL (p53, LI: 30%)

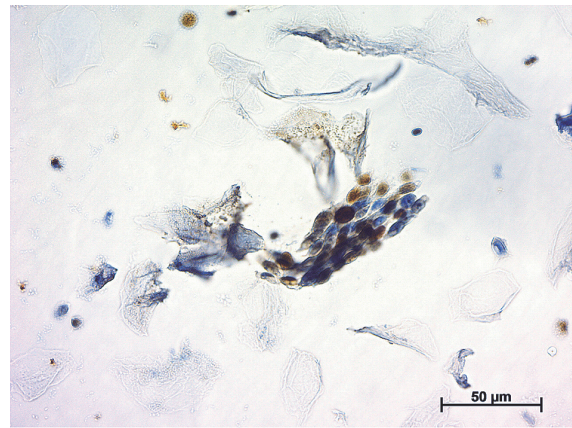


図 13 SCC (p53, LI: 70%)

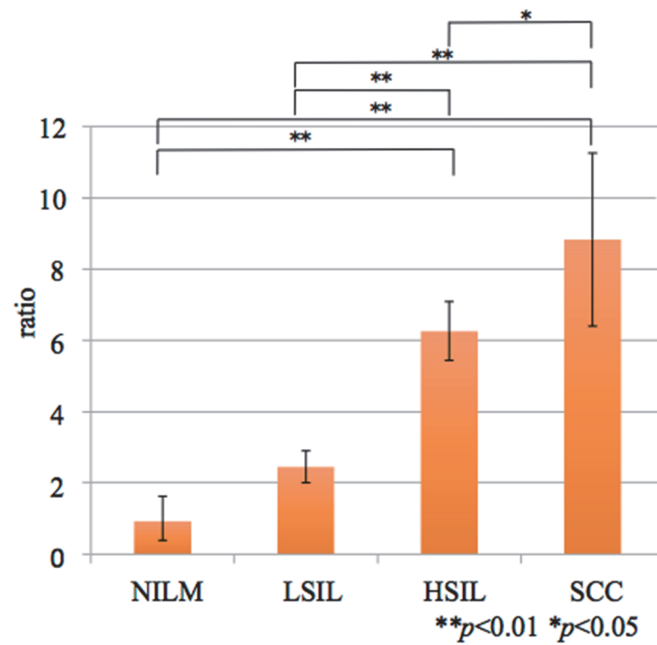
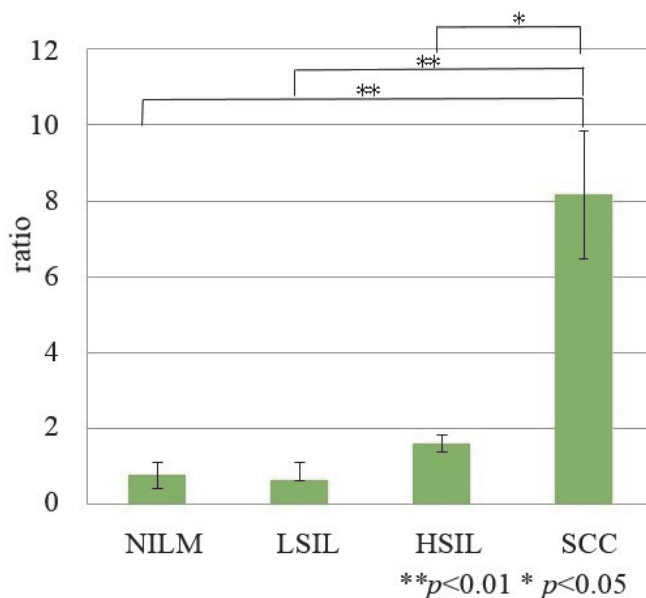


図 14 RT-PCR の解析による *hnRNP K* mRNA 発現量

図 15 RT-PCR の解析による *TP53* mRNA 発現量

考 察

現在日本の口唇、口腔および咽頭領域に発生する悪性腫瘍による死亡者数は、平成 24 年度に 7,167 名であり過去 5 年間で微増を続けている⁶⁾。過去 50 年間で比較すると男性が約 10 倍、女性が約 7 倍に増加した。口腔・咽頭領域のがん死亡率（1 年間に人口 10 万人あたり何人死亡するか）は、男性が 8.4 人、女性が 3.1 人であり、1993～2002 年までに口腔がんを診断を受けた患者の 5 年生存率はほぼ横ばいで 50%⁷⁾ であるにも関わらず、口腔がんの早期発見は、いまだに確立されていない。したがって、口腔がんによる死亡者を減少させるためには、前がん病変ないし早期がんの段階で発見する、いわゆる早期発見に務める必要がある。

細胞診は、Papanicolaou が 1942 年に細胞診染色法である Papanicolaou 法を発表し、子宮頸がん症例で異型細胞を報告したのが最初である。国内では細胞診正診率は 92% といわれているが、口腔領域においては、擦過細胞診の必要性が疑問視されたことにより口腔細胞診の普及が遅れた。しかし、口腔がん死亡率が微増し続けている状況より、口腔がん検診が展開され始めた。細胞診の手法のひとつとして、液状化検体細胞診 (liquid-based cytology; LBC) も行われている⁸⁾。細胞診を用いた口腔がん検診によるがん発見率は 0.1～1.1% であり、他臓器がんと比べても遜色ない値である²⁾。口腔がんを発見する機会は歯科医師が圧倒的に多く、その 9 割以上が歯科医院で歯科医療に従事している。かかりつけ歯科医が細胞診を習得し、口腔が

ん受診率を上げることが課題である。

これまで細胞診の診断基準は Papanicolaou クラス分類が用いられてきたが、子宮頸部で発達してきた Papanicolaou 分類は、がんの発育過程の異なる口腔には不向きで、従来のクラス分類の II あるいは IV に曖昧な点が多かったことにより、子宮頸部細胞診の報告様式 (ベセスダシステム) の根底にある 1. 標本不適の評価、2. 推定診断を目指した記述用語の使用、3. 教育的注釈と提案の追加も重視した新報告様式が採用された⁹⁻¹¹⁾。その判定区分は (1) 検体不適正、(2) 検体適正、1) 正常および反応性あるいは上皮内病変や悪性腫瘍性変化がない NILM、2) 低異型度上皮内腫瘍性病変あるいは上皮性異形成相当 LSIL、3) 高異型度上皮内腫瘍性病変あるいは上皮性異形成相当 HSIL、4) 扁平上皮癌 SCC、5) 鑑別困難 IFN (indefinite for neoplasia) となっている。

本区分の特徴は LSIL、HSIL を設けたことにある²⁾。LSIL は、従来 Class II とされた症例に少なからずがんが包含されることの是正のため設定された。細胞診で腫瘍性変化を的確に判定、治療方針の指針となること、一般歯科診療所で患者に根拠ある説明を可能にすることも目的としている。口腔粘膜擦過では表層細胞のみ採取されることが多い。HSIL は口腔がんの特徴である表層分化型の上皮内がんを、角化あるいは表層細胞のみでも拾い上げることを目的とし設けられた。従来 Class IV より腫瘍性変化に重点を置き高次医療機関で早期に積極的な治療を可能にすることを目的としている。しかしながら、これらの診断基準にも判

定者によって誤差が生じることは不可避である。また、前がん病変における明確な基準になり得る新規マーカーについての検討は、これまでに多くは行われていない。

これまでに北野ら¹²⁻¹⁵⁾は Dark-Agouti (DA) ラットおよび Wistar/Furth (WF) ラットによる、舌がんの発がんモデル実験を行い、DA ラットは舌がん感受性が高いことを明らかにした。さらに、舌がん関連遺伝子の個別解析についても検討し、ラット第17番染色体 (RNO7) に含まれる発がん関連の候補遺伝子 hnRNP K の研究を行い、hnRNP K 抗体が前がん病変の診断マーカーとして有用であると示唆した³⁾。hnRNP K はクロマチンの再形成や mRNA への転写後、mRNA と結合して核外への輸送、修飾および翻訳に関係し、hnRNP K homology (KH) ドメインを3カ所有する RNA 結合タンパク質である。合成された直後の mRNA と結合して核と細胞質との間で往復輸送を行うため、hnRNP K は核と細胞質の両方に存在している。Moumen⁴⁾らは hnRNP K の誘導は、特に DNA 損傷時に反応して活性化されることを示唆しているが、これまでの研究で明らかになった発がん剤 4NQO による DNA 損傷に対する hnRNP K タンパクの高発現は、それを裏付ける結果であり上皮性異形成や SCC において核が陽性を示したのは、p53 と hnRNP K が共存的に DNA 損傷部の修復を行い、転写を活性化させているためである⁴⁾。相対定量的リアルタイム PCR 解析でも *hnRNP K* mRNA 量は有意に増加し、過形成および上皮性異形成で hnRNP K タンパクが発現していた免疫染色結果を裏付けている¹⁶⁾。細胞損傷時に hnRNP K は p53 と共に損傷を受けた細胞の DNA の p53 プロモーター領域に共依存的に結合し mRNA を抑制するだけでなく、p21 の誘導にも関与し、細胞周期チェックポイントの抑制を行っている¹⁷⁾。さらに、ATM および ATR によって p53 と共にリン酸化される標的となり、MDM2 を分解へと進ませる。それは DNA 損傷後の p53 による転写抑制の一部を hnRNP K が担っていることを示唆するものであるが、免疫染色において p53 の発現を検出することは組織固定などの面で困難であることが多い³⁾。これまでの研究で、p53 と共依存的に働く *hnRNP K* mRNA の検出により、DNA 損傷による細胞修復および転写抑制が行われる病態が明らかになった³⁾。特に *hnRNP K* mRNA および hnRNP K が過形成および上皮性異形成の DNA 損傷において高発現することは、診断ならびに腫瘍マーカーとして有用であるといえる。様々なタイプのがんにおいて、hnRNP K と p53 が高発現することは、hnRNP K と p53 の関係性より

明らかである¹⁸⁾。そこで本研究は、液状化検体細胞診を用いて、前がん病変の診断に有用な新規マーカーの検索を行ったものである。

本研究の液状化検体細胞診の標本における hnRNP K の免疫染色による診断基準は、核への染色率を用いた。その染色結果はこれまでの研究³⁾における組織診での結果と一致した。また今回 p53 は HSIL と SCC で核への染色性を示したが、これは p53 が SCC 組織診標本において、基底細胞層や傍基底細胞層の核へ染色性を示すことと関連していると考えられる。擦過細胞診で常に基底細胞層の細胞を採取することは組織学上にも不可能である。しかし高度上皮性異形成の病変になって上皮内の構造が乱れることによって初めて、擦過細胞診時に基底細胞層や傍基底細胞層細胞採取が可能となる。このことから細胞診で p53 の発現をみる段階は、SCC に近い状態であると推測される。また mRNA の発現結果において、*hnRNP K* は *TP53* と比較し軽度の前がん病変の段階で発現を示しており、このことも過去の組織診での研究結果³⁾に一致している。

本研究での結果により、hnRNP K は組織診診断だけでなく、細胞診診断においての新規マーカーとしても有用性を持っていると考えられた。今回細胞診での免疫染色における hnRNP K の発現は、核が染色されていないものを NILM、50%以下の核染色率を LSIL、60~80%を HSIL、90%以上を SCC として判定をした。この判定基準は NILM と SCC では判断が容易であると思われるが、LSIL から HSIL の境界病変においては誤差が生じやすい。境界病変における hnRNP K の染色性は細胞質から核へ移行していく過程にあるため、現在は明確な染色の判定基準が確立されていない。今後より精細な診断基準の確立を行うことで、hnRNP K の前がん病変診断への有用性向上が期待できる。液状化検体細胞診において PAP 染色による判定に加え、診断の補助的因子として免疫染色や遺伝子学的検索を併用することによって、さらに高精度なスクリーニングが可能になると考えられる。

結 論

液状化検体細胞診において免疫染色や RT-PCR を用いて比較検討を行った結果、以下の結論を得た。

1. 液状化検体細胞診は、hnRNP K や p53 の免疫染色が可能であることに加え、沈渣 (細胞数) の量に応じて RNA 抽出時プロトコルを応用し、RT-PCR 法が可能であることで、診断への応用が期待できる。

2. 免疫染色で hnRNP K の核への発現の移行は, LSIL より発現を示し, その発現程度は NILM<LSIL<HSIL<SCC の順を反映していた. さらにこの結果は組織診での染色結果と一致した. よって hnRNP K は細胞診における前がん病変の判定にも有用であると考えられる.
3. 液状化検体細胞診で *hnRNP K* と *TP53* の mRNA 発現量を定量比較することは, 口腔前がん病変の細胞診の精度向上に寄与することが期待できる.

引用文献

- 1) 坂本穆彦. 細胞診を学ぶ人のために. 第5版. 東京; 医歯薬出版: 1-7.
- 2) 公益社団法人日本臨床細胞学会. 細胞診ガイドライン 5 消化器 2015 年度版. 東京; 金原出版: 18-30.
- 3) 坂野美栄. hnRNP K と 4NQO 誘発ラット舌前癌病変との関連. 岐歯学誌. 39 巻 1 号. 2012 年 5 月: 1-7
- 4) Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ and Jackson SP. hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell*.2005; 123: 1065-1078.
- 5) Haley B, Paunesku T, Protic M and Woloschak GE. Response of heterogeneous ribonucleoproteins (hnRNP) to ionizing radiation and their involvement in DNA damage repair. *Int J Radiation Biol*. 2009; 85: 643-655.
- 6) がん登録・統計, がん情報サービス, 国立がん研究センター: http://ganjoho.jp/reg_stat/index.html.
- 7) 人口動態調査 (がんによる部位別死亡者数). 厚生労働省 http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/gan_toukei.html.
- 8) 田中陽一. 口腔がんを早期に発見するために歯科における地域連携と“病理の役割”. 歯科学報. 2012; 112: 22-31.
- 9) 平井康夫 監訳. Solomon R and Nayar R 編, ベセスダシステム 2001 アトラス Springer Japan, 東京, 2007.
- 10) Solomon D and Nayar R. The Bethesda system for reporting cervical cytology Second ED, Springer, New York, 2004.
- 11) Davey D and Kurman R. Forum group members; Bethesda 2001 workshop: The Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*.2002; 287: 2114-2119.
- 12) Kitano M, Hatano H and Shisa H. Strain difference of susceptibility to 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinoma in rats. *Jpn J Cancer Res*.1992; 83: 843-850.
- 13) Kitano M. Host genes controlling the susceptibility and resistance to squamous cell carcinoma of the tongue in a rat model. *Pathol Int*. 2000; 50: 353-362.
- 14) Tanuma J, Shisa H, Hiai H, Higashi S, Yamada Y, Kamoto T, Hirayama Y, Matsuuchi H and Kitano M. Quantitative trait loci affecting 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in the rat. *Cancer Res*. 1998; 58: 1660-1664.
- 15) Tanuma J, Fujii K, Hirano M, Matsuuchi H, Shisa H, Hiai H and Kitano M. Five quantitative trait loci affecting 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue cancer in rat. *Jpn J Cancer Res*. 2001; 92: 610-616.
- 16) Bomsztyk K, Van Seuning I, Suzuki H, Denisenko O and Ostrowski J. Diverse molecular instructions of the hnRNP K protein. *FEBS Lett*. 1997; 403: 113-115.
- 17) Enge M, Bao W, Hedstrom E, Jackson SP, Moumen A and Selivanova G. MDM2-dependent downregulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53. *Cancer Cell*. 2009; 15: 171-183.
- 18) Pino I, Pio R, Toledo G, Zabalegui N, Vincent S, Rey N, Lozano MD, Torre W, Gracia-Foncillas J and Mountuenga LM. Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer*. 2003; 41: 131-143.