

Basic study on factors to affect cytological diagnoses of the oral  
exfoliative cytology

(口腔擦過細胞診の細胞判定に係る要因に関する基礎的研究)

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

口腔病理学

瀬戸宏之

(指導:久山 佳代 教授)

# 目次

参考論文

Abstract

第1章 従来型塗抹法と液状化検体処理法における口腔擦過細胞診所見  
の比較検討

緒言

対象及び方法

結果

第2章 口腔細胞診における深層型扁平上皮細胞の細胞学的検討

緒言

対象及び方法

結果

考察

結論

総括

参考文献

## 参考論文

本論文は、主となる参考論文「Comparative Study of Cell Findings by Conventional Smear and Liquid-Based Cytology for Oral Exfoliative Cytology」Open Journal of Stomatology 10(174-188), DOI: 10.4236/ojst.2020.107017,2020 及び副となる参考論文「口腔細胞診における深層型扁平上皮細胞の細胞学的検討」日本臨床細胞学会雑誌(印刷中), 2020 をまとめたものである.

## **Abstract**

Cytomorphological analyses to 2 factors which affect cytological judgment were performed; the effects on cell findings by which the difference in the method of manufacturing cyto-diagnostic specimens and deep-layer squamous cells depend on cytological judgement in screening.

In chapter 1 study, the aim of this study was to compare cytological findings between conventional cytology (CVC) and liquid-based cytology (LBC) using cytomorphological image analysis. Cytological specimens were collected from 20 patients (negative for squamous neoplasia in 10, dysplasia in 5, squamous cell carcinoma in 5) and 5 controls of the tongue between January 2017 and December 2018. Two different preparation techniques were investigated cytomorphologically for CVC and LBC (BD Cytorich™). LBC showed significantly higher cell numbers than CVC for all lesions. LBC-to-CVC ratio ranged from 9.52 (hyperkeratosis) to 1.87 (superficial cells in oral squamous cell carcinoma (OSCC)). Nuclear area of normal, hyperkeratosis, and inflammation were significantly higher in LBC than those of CVC. Hyperchromasia was significantly more frequent with CVC than with LBC for hyperkeratosis, inflammation, dysplasia and OSCC. There was no

significant difference in circularity between CVC and LBC among all lesions.

In chapter 2 study, the aim of this study was to clarify the cytological characteristics of deep-layer squamous cells by cytological classification and to quantify of subjective diagnosis in screening. The subjects of 384 oral cytology specimens obtained from margin of tongue between January and December 2016. The cytological images were analyzed using an image analysis software to quantitatively measure the cell and nuclear area, N/C ratio, nuclear irregularity and hyperchromasia. Deep-layer squamous cells were seen in 27 cases (8.6 %) of Negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM), 1 case (2.0 %) of squamous intraepithelial lesion or malignancy, 8 cases (40.0 %) of OSCC. The average nuclear area was  $66.0\mu\text{m}^2$  of NILM and  $82.6\mu\text{m}^2$  of OSCC. The average nuclear irregularity was 1.25 of NILM and 1.29 of OSCC. A significant difference was found in the nuclear area and irregularity indexes between NILM and OSCC.

To summarize the two studies, only one cytomorphological disadvantage was seen with LBC, in the form of decreased hyperchromasia in chapter 1, and the nuclear area and nuclear irregularity index of the deep-layer squamous cells were higher than OSCC as compared to NILM in chapter 2.

## 第1章 従来型塗抹法と液状化検体細胞診における口腔擦過細胞診所

### 見の比較検討

#### 緒言

口腔扁平上皮癌(OSCC)は世界では一般的な癌腫に含まれ、年間に男性 270,000 例, 女性 143,000 例が発生する[1] [2]. 新しい治療法の発展にも関わらず, 約 50 %が診断後 5 年以内に死亡している[3]. 歯科医師による早期発見が OSCC 死亡率の低下を導く可能性があるため, 口腔がんのスクリーニング法のひとつである口腔の擦過細胞診(EC)が近年, 急速に拡大及び改良されてきた. 最初に細胞診により子宮頸部での悪性細胞を観察したのは Papanicolaou による[4]. 一方, 口腔 EC を適用したのは 1963 年であるが, Papanicolaou 染色による婦人科細胞診のように普及[5] [6]しなかった. なぜなら口腔 EC は OSCC 発見の感度が低いと報告されたことによる[7] [8]. さらに OSCC の偽陰性率を導く不適切な細胞採取法, 標本作製上の失敗や細胞誤判定などの様々な要因が記述された[9] .

ところが 1990 年以降, 液状化検体細胞診(LBC)が従来型塗抹細胞診(CVC)と比べて標本の質を改善する手法[10]として普及し始め, 子宮頸部領域では悪性所見の早期発見により感度と特異度が向上し, さらに標本作製

過程の失敗が最小限に抑制されると報告された[11] [12]. やがて LBC の有用性は婦人科領域以外の甲状腺[13]や副甲状腺 [14]でも認められ, 口腔 EC での応用に関する報告も散見された[15] [16] [17] . しかし一方で, LBC 標本は細胞形態が明瞭であるが, 高度腫瘍性病変での細胞背景所見が消失する問題点も挙げられた[18]. 以上の LBC に関する議論が存在するが, 2 種類の標本作製法に関する細胞形態の差異に関するデータは稀少である.

本研究の目的は, 口腔粘膜疾患における CVC と LBC の細胞所見の観察及び細胞形態画像解析にて比較することである.

## 被検症例と方法

### 1. 被検症例

口腔 EC 材料は 2017 年 1 月から 2018 年 12 月までに日本大学松戸歯学部付属病院にて細胞診及び病理組織診断を実施した 20 例 (正常及び反応性あるいは上皮内病変や悪性腫瘍性変化がない : negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM) 10 例, 上皮内腫瘍性病変あるいは上皮性異形成相当 : squamous intraepithelial lesion (SIL) 5 例, 扁平上皮癌 squamous cell carcinoma (SCC) 5 例) とした. NILM は炎症 5 例及び過角化症 5 例から構成された. 被検症例の詳細は Table 1 に示した. 20 例の詳細は男性 10 (平均  $55.1 \pm 18.9$  歳) と女性 10 (平均  $63.9 \pm 16.5$  歳) であった. 対象は細胞診施行後に病理組織診断を得るために生検が試行された舌縁症例のみを抽出した. 対照は, 健常な舌縁粘膜 10 例 (平均  $36.0 \pm 13.7$  歳) から作製した EC 標本とした. 対象から全身疾患及び過去 2 年間のそれに関する治療経験, 口腔粘膜に影響を与える習慣 (飲酒, 喫煙, 含嗽剤の過度な使用) 及び口腔カンジダ症を有する者, 義歯及び矯正器具を装着する者を除外した. 本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承諾を得て行った (EC-15-14-033-1).

### 2. 方法



### (1)細胞採取法

細胞採取は口腔細胞診専用ブラシ(Orcellex® brush RT; Becton, Dickinson and Company, Tokyo, Japan) [19]にて, 病変を10回擦過した. すべての標本作製はスプリットサンプル法にて行った.

### (2)標本作製法

CVC は, ブラシで採取した細胞を速やかにスライドガラスに塗抹し, 95 %エタノール溶液に浸漬固定を3時間行い, 通法に従って Papanicolaou (PAP) 染色を行った. 塗抹後のブラシは LBC 専用固定液 (Cytorich™ red; BD) に浸漬固定を30分行った. LBC 標本作製 (BD Cytorich™ as SurePath™ manual method; BD) はマニュアルに従って行った. すなわち, LBC 専用固定液は 2,000 rpm で5分間遠心分離を行い, 上清を廃棄した. さらに 500ml の精製水を追加して沈殿物と攪拌し, 専用スライドガラスにチャンバーを用いて倒立させ 10分放置した. スライドガラス上の上清を廃棄後, 100 %エタノール溶液により 2回洗浄した. 余剰なエタノール溶液を除去後, 通法に従い Papanicolaou (PAP) 染色を行った.

### (3)細胞判定及び病理組織診断

細胞判定は1人の細胞検査士と2人以上の細胞診専門歯科医により行った. 検鏡にて背景, 細胞分布, 集塊, 核及び細胞形態を観察した. 病理組

織学的診断は2人以上の口腔病理医により、WHO [20]の基準に準拠して行われた。

#### (4)細胞形態画像解析

各スライドガラスは、中央を基準に対物レンズ40倍で10視野の非連続領域について評価した。10視野の出現細胞数を計測し、1症例あたり平均50細胞以上を細胞形態画像解析に供した。また、CVCとLBCの出現細胞数の比率を算出した。扁平上皮異型細胞は、各2人の細胞検査士と細胞診専門歯科医によって抽出された。OSCC症例の扁平上皮異型細胞は、深層型と表層型扁平上皮異型細胞に分類した。細胞は、核縁に焦点が合った状態で顕微鏡用デジタルカメラDP74 (Olympus, 東京, 日本) の対物レンズ40倍にすべて同一条件に設定して撮影した。

撮影した画像の詳細は、解像度が横4,080 pixel 縦3,072 pixel, 撮影範囲は横440  $\mu\text{m}$  縦331  $\mu\text{m}$  であった。画像解析ソフト (cellSens® software; Olympus, 東京, 日本) にて計測した。画像解析は、核面積, 核濃染性, 核形不整と円形度について数値化した。

#### (5)統計学的解析

すべての統計学的解析はSPSS for Windows version 14.0J (IBM, Tokyo, Japan)によって行った。統計解析はWilcoxon signed-rank test, the Kruskal-

Wallis test と Steel-Dwass test を用いた.  $p < 0.05$  を有意差ありと判定した.

## 結 果

### 1. 細胞所見

代表的な細胞写真を Fig.1 に示す. すべての症例で CVC (Figs. 1 (a1)-(d1)) と比較して LBC (Figs. 1 (a2) - (d2)) は有意に多くの細胞量が認められた. LBC でわずかに細胞重積性がみられたが, 細胞判定に影響はなかった. 殆どの症例で LBC は炎症性及び壊死性背景が減弱していた. 過角化症では, 角質片と正角化型扁平上皮細胞が主体であり (Fig. 1 (a1), Fig. 1 (a2)) , CVC では角化型扁平上皮細胞と角質片の集塊が形成されていた. CVC (Fig. 2 (a1)) と比較して LBC ではやや不規則な核縁, 明瞭な核内構造と顆粒状クロマチンを呈していた (Fig. 2 (a2)). 炎症ではいずれにも軽度核腫大を呈する非あるいは錯角化型扁平上皮細胞と角質片が観察された (Fig. 2 (b1,b2)). LBC では, 細胞が孤立し細胞質及び核の透明性が亢進していた (Fig. 2 (b2)). 上皮性異形成では, CVC は細胞採取量が少なく, 表層型扁平上皮異型細胞の細胞質が厚く, 核縁不均等肥厚, クロマチンの不均等分布や過染や N/C 比増大が認められた (Fig. 2 (c1)). LBC では孤立した表層型扁平上皮異型細胞の辺縁不整がみられるが, 核内構造が CVC よりも明瞭で

あった (Fig. 2 (c2)). OSCC では染色性の多彩性がいずれにも認められた (Fig. 1 (d1), Fig. 1 (d2)). CVC では深層型扁平上皮異型細胞と表層型扁平上皮異型細胞が混在し (Fig. 1 (d1)), それぞれが LBC では集塊を形成していた (Fig. 2 (d2)). 核内構造は LBC の方が明瞭で明るく, 中等度核縁肥厚が認められた (Fig. 2 (d2)).

## 2. 細胞形態画像解析

### (1) 標本作製法の比較検討

細胞形態画像解析の標本作製法による比較結果を Table 2 に示す. 健常及びすべての疾患で LBC は CVC と比較して有意に高い細胞数が観察された. 症例間で比較すると, 過角化症の細胞数が OSCC 以外の他疾患と比較して CVC (21.27) と LBC (202.40) のいずれも有意に少なかった. LBC と CVC 比は過角化症 (9.52) から OSCC の表層型扁平上皮異型細胞 (1.87) の範囲であった. 核面積において最も顕著に核腫大が認められたのは CVC (57.99) と LBC (74.95) のいずれも炎症であった. そしていずれの疾患の核面積も LBC が CVC よりも大きい傾向にあり, 特に健常, 過角化症, 炎症で有意差が認められた. 核濃染性は, 炎症の CVC (173.59) と LBC (157.36) のいずれにも, 続いて CVC での OSCC の表層型扁平上皮異型細胞で認められた. 過角化症, 炎症, 上皮性異形成, OSCC の表層型・深層型扁平上皮

異型細胞の CVC は LBC よりも有意に高値であった。核形不整はすべての病変で LBC は CVC よりも高く、特に LBC の炎症 (23.64) と OSCC の深層型扁平上皮異型細胞(18.18) で有意に高値であった。円形度については、いずれの病変でも標本作製の違いで有意差は認められなかった。

Table 1 被検症例の一覧

Case	Age (years)	Sex	Location	Cytological diagnosis	Histopathological diagnosis
1	25	Male	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	_____ <sup>5</sup>
2	23	Male	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	_____ <sup>5</sup>
3	31	Male	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	_____ <sup>5</sup>
4	48	Female	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	_____ <sup>5</sup>
5	53	Female	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	_____ <sup>5</sup>
6	24	Male	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Inflammation
7	63	Female	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Inflammation
8	83	Female	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Inflammation
9	35	Male	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Inflammation
10	44	Female	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Inflammation
11	76	Male	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Hyperkeratosis
12	84	Male	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Hyperkeratosis
13	88	Female	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Hyperkeratosis
14	36	Female	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Hyperkeratosis
15	41	Male	Tongue <sup>1</sup>	NILM <sup>2</sup>	Hyperkeratosis
16	64	Male	Tongue <sup>1</sup>	SIL <sup>3</sup>	Dysplasia
17	61	Female	Tongue <sup>1</sup>	SIL <sup>3</sup>	Dysplasia
18	70	Female	Tongue <sup>1</sup>	SIL <sup>3</sup>	Dysplasia
19	54	Male	Tongue <sup>1</sup>	SIL <sup>3</sup>	Dysplasia
20	60	Female	Tongue <sup>1</sup>	SIL <sup>3</sup>	Dysplasia
21	71	Male	Tongue <sup>1</sup>	SCC <sup>4</sup>	OSCC <sup>6</sup>
22	52	Male	Tongue <sup>1</sup>	SCC <sup>4</sup>	OSCC <sup>6</sup>
23	50	Male	Tongue <sup>1</sup>	SCC <sup>4</sup>	OSCC <sup>6</sup>
24	56	Female	Tongue <sup>1</sup>	SCC <sup>4</sup>	OSCC <sup>6</sup>
25	78	Female	Tongue <sup>1</sup>	SCC <sup>4</sup>	OSCC <sup>6</sup>

<sup>1</sup> Margin of tongue

<sup>2</sup> Negative for intraepithelial neoplasia or malignancy

<sup>3</sup> Squamous intraepithelial lesion

<sup>4</sup> Squamous cell carcinoma

<sup>5</sup> No biopsy was performed

<sup>6</sup> Oral squamous cell carcinoma

Table 2 従来型細胞診と液状化検体細胞診における細胞画像解析結果の病変間比較

Histopathological diagnosis	Preparation method	Nuclear findings							
		Cell number	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Hyperchromasia	Irregularity	Circularity			
Normal	CVC	Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	27.53 2.77	38.04 7.82	90.33 23.80	11.09 3.09	0.75 0.19		
	LBC	Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	248.60 19.04	50.05 3.83	125.33 21.34	12.56 2.81	0.76 0.01		
Hyperkeratosis	CVC	Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	21.27 4.86	35.21 8.62	88.27 12.19	9.97 2.40	0.66 0.10		
	LBC	Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	202.40 35.00	49.55 9.05	68.91 13.76	10.61 4.07	0.67 0.16		
Inflammation	CVC	Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	29.93 8.03	57.99 15.20	173.59 15.48	18.15 5.04	0.69 0.09		
	LBC	Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	281.20 59.56	74.95 26.39	157.36 27.95	23.64 27.14	0.77 0.10		
Dysplasia	CVC	Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	25.53 9.24	49.56 17.73	85.18 21.96	13.69 4.57	0.65 0.14		
	LBC	Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	236.47 62.00	50.03 7.87	76.11 24.79	15.36 4.81	0.70 0.17		
OSCC	CVC	Deep cells		Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	41.33 14.59	53.73 18.55	116.82 26.62	13.41 6.28	0.70 0.15
		LBC		Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	312.27 46.87	54.52 20.28	75.03 25.79	14.53 3.56	0.72 0.12
	CVC	Superficial cells		Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	17.23 3.48	48.32 15.40	138.17 23.89	15.16 3.79	0.74 0.11
		LBC		Ave <sup>1</sup> SD <sup>2</sup>	32.15 6.49	53.02 15.37	98.82 29.07	18.18 4.55	0.75 0.11

<sup>1</sup> Average

<sup>2</sup> Standard deviation

従来型塗抹細胞診

液状化検体細胞診

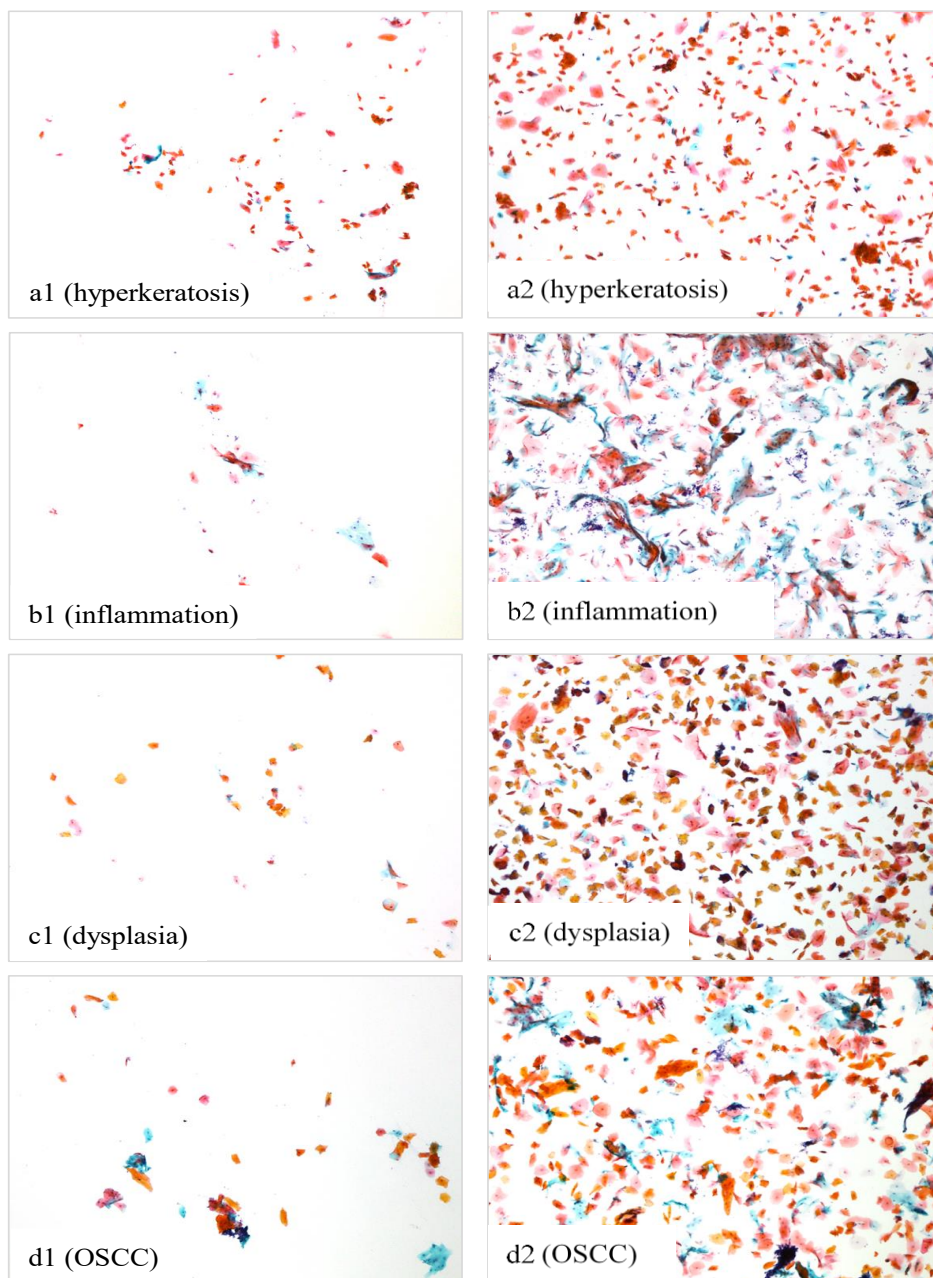


Fig.1 4病変の従来型塗抹・液状化検体細胞診所見

(x4, Papanicolaou 染色, OSCC: Oral squamous cell carcinoma)

a1-d1:出現する細胞集塊が少ない.

a2-d2: 多数の細胞集塊が認められる.



従来型塗抹細胞診

液状化検体細胞診

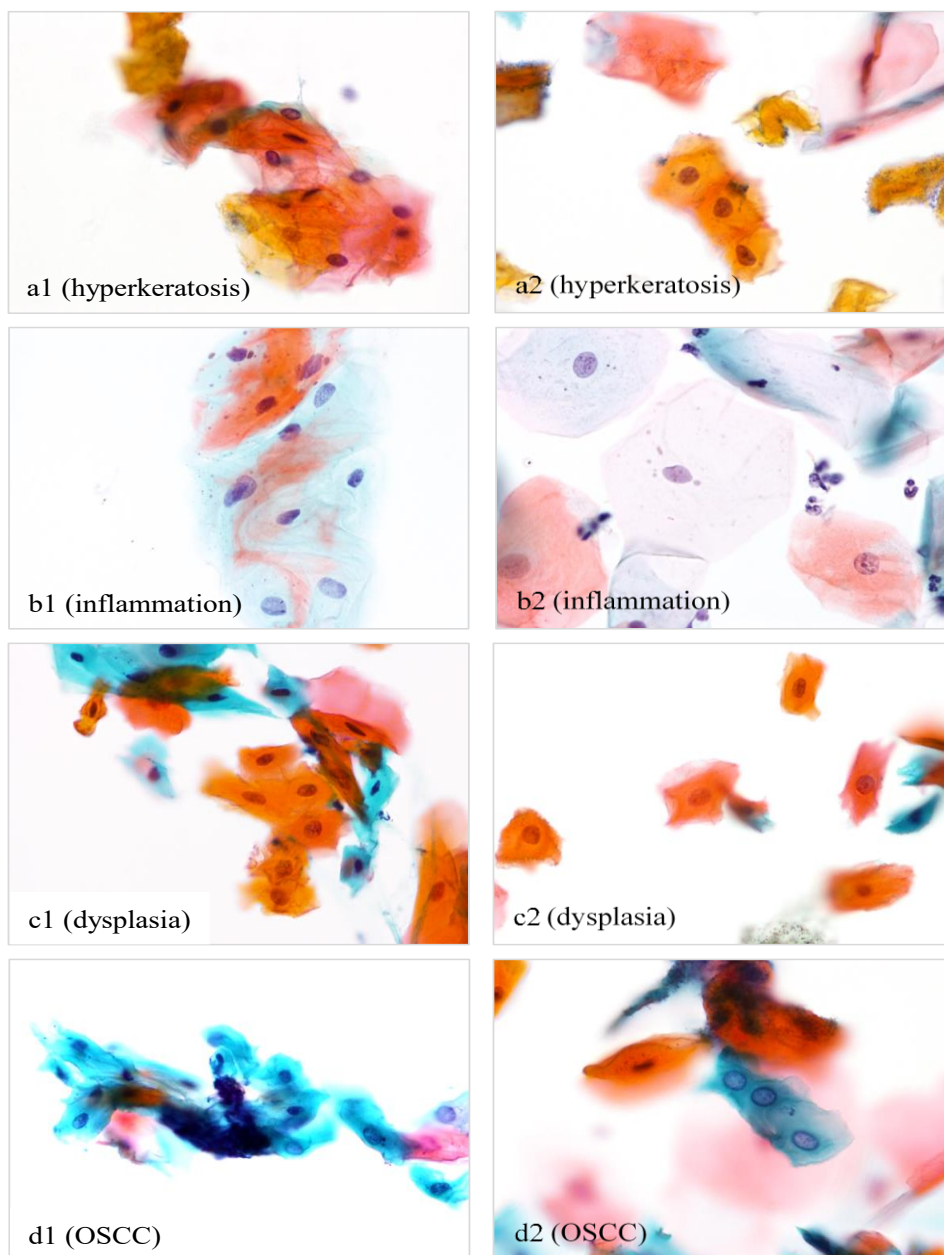


Fig.2 4病変の典型的な従来型塗抹・液状化検体細胞診所見

(x60, Papanicolaou 染色, OSCC: Oral squamous cell carcinoma)

a1-d1: 過角化症, 上皮性異形成, OSCC (深層型扁平上皮細胞) に核濃縮が

認められる. a2-d2: 全病変の核内構造が明瞭である.

## 第2章 画像解析による口腔細胞診深層型扁平上皮細胞の形態学的検討

### 緒言

口腔細胞診は癌のスクリーニングを主目的としており、その簡便さから EC が普及しつつある。口腔細胞診の判定は、2015 年細胞診ガイドラインにおいてはじめて明示された。その中で、深層型扁平上皮異型細胞が OSCC の判定に重要な所見と位置付けられている[21]。しかしながら臨床的に頻繁にみられる肉眼的に白板症を呈する OSCC は角化を伴う表層分化を特徴としており、細胞診では深層型扁平上皮細胞の採取や検出は非常に困難である。また、潰瘍性病変では比較的容易に深層型扁平上皮細胞が採取されるが、その細胞が真の腫瘍性変化なのか、或いは反応性のものなのかの判定が難しいこともある。これは深層型扁平上皮細胞の細胞所見の蓄積が乏しいことによる。

深層型扁平上皮異型細胞の判別は、EC で主体をなす表層型扁平上皮細胞との相対的な比較や、鏡検者の経験に基づき主観的に行われている。そのため、検鏡者間或いは施設間で明確に統一されていない。また、スクリーニング時に重要視されている細胞所見についてもはっきりしていない。

そこで、細胞診判定別に出現した深層型扁平上皮細胞の特徴を明らかにし、スクリーニングでの主観的判定を数値化する目的で、深層型扁平上皮細胞

胞の細胞形態画像解析を施し、比較検討した。

## 被検症例及び方法

### 1. 被検症例

本研究は、日本大学松戸歯学部付属病院病理診断科において、2016年1月から2016年12月の1年間に実施された2,072件の擦過法による細胞診(直接塗抹法)のうち、舌縁部から検体が採取された384例(全体の16.8%、舌症例の46.4%)を被検症例とした。内訳は、細胞診実施時の4段階評価では、NILM:314症例、Low SIL (LSIL):48症例、High SIL (HSIL):2症例、SCC:20症例で、平均年齢が63.7歳(6-98歳)、男性152名、女性232名であった。本研究では、LSIL及びHSILを区分せず、まとめてSILとした。深層型扁平上皮細胞は、NILM群、SIL群、SCC群の3群間で比較解析した。本研究は本学倫理委員会の承認を得て行った(承認番号:EC18-15-14-033-2号)。

### 2. 方法

#### 1)細胞診標本の作製

細胞診検体の採取には、子宮頸管細胞診断用ブラシ Cytobrush Plus (Medscand Inc., Florida, USA) が使用された。95%エタノールによる浸漬固定を約24時間行った。検体は通法に従いPAP染色が施行された。ギル・ヘ

マトキシリン 5 (武藤化学株式会社, 東京, 日本) を使用し, 核染色を行った.

なお, 染色時間は 3 分, 色出しは水道水にて 5 分を行った.

## 2) 細胞像の撮影

対象となった 384 例すべての PAP 染色スライドガラス標本は 1 名の細胞診専門歯科医が正立明視野顕微鏡 BX51 (OLYMPUS, 東京, 日本) にて細胞診スクリーニング時の条件と同様の対物レンズ 10 倍以上で観察し, 周囲の細胞と比較し次の条件に該当する細胞を写真撮影した.

条件①: 標本の中で核・細胞質比 (N/C 比) が極めて高い細胞

条件②: 細胞質がライトグリーンに濃染する細胞

除外条件: 固定不良や乾燥により変性をきたした細胞

細胞は第一章と同様の条件で撮影された. 撮影した細胞像は, 各 2 名ずつの細胞診専門歯科医と細胞検査士により検体採取部位 (舌縁部) 以外の情報をブラインドし個別に確認した. 撮影者を含め 5 名全員が深層型扁平上皮細胞の範疇に入ると判断した細胞を抽出した.

## 3) 細胞像の画像解析

細胞像の解析は, ImageJ (version 1.51i, National Institutes of Health, Maryland, USA) を用いた. 細胞と核それぞれに画像解析の対象とする領域 (関心領域) を設定し, 形態と色の解析を行った. 形態解析では, 核面積,

細胞面積, N/C 比, 核形不整の程度を算出した. 核形不整の程度を現す指標には, フラクタル解析 (box counting 法) により算出されたフラクタル次元を用いた. 核の色解析では, 核の濃染性を算出した. 核の濃染性は, 撮影した画像を 8 bit グレースケール (256 階調) 画像に変換し核の明度を算出し, 関心領域における明度の平均値とした. 尚, 細胞集塊が重積し個々の細胞形態や色調が明瞭ではない細胞は画像解析から除外した. 各群間に有意差を認めたものは, 四分位数に基づく箱ひげ図 (最大値と最小値を含む) と蜂群図を重ねたグラフを作成した.

#### 4) 統計学的検討

統計ソフトウェア (R version 3.3.0, the R Development Core Team) を用いて細胞診判定別 (NILM, SIL, SCC) の群間で統計学的有意差検定を行った. 深層型扁平上皮細胞の出現率は, Pearson's Chi-squared test にて検討した後, 有意差があった群を Ryan's method を用いて検定した. 深層型扁平上皮細胞が出現した症例のうち解析対象細胞が含まれている症例における深層型扁平上皮細胞の 1 症例あたりの出現個数は, 対象症例が 1 症例であった SIL を除外し NILM-SCC 間で F test を行った後, Student's t-test にて行った. 核面積, 細胞面積, N/C 比, 核形不整の程度, 核の濃染性は Bartlett's test による分散の均一性を確認した後, Tukey's honestly

significant difference testにて検定を行った。有意水準は5%以下とした。

## 結 果

### 1. 深層型扁平上皮細胞の出現頻度

対象となった384例のうち、深層型扁平上皮細胞が出現した症例数(頻度)は36例(9.4%)であった。詳細は、平均年齢(標準偏差)64.1歳(14.7)、年齢範囲20-85歳、男10名、女26名であった。細胞診判定別の深層型扁平上皮細胞出現症例数は、NILM:27症例(8.6%)、SIL:1症例(2.0%)、SCC:8症例(40.0%)であった。

### 2. 深層型扁平上皮細胞の細胞形態画像解析

画像解析対象とした深層型扁平上皮細胞は、計168個(30症例)、その内訳はNILM126個(22症例)、SIL3個(1症例)、SCC39個(7症例)であった(Table 1)。深層型扁平上皮細胞が出現した症例のうち、解析対象細胞が含まれた1症例あたりの出現個数の平均は、NILM7.6個、SIL3.0個、SCC5.6個となった。尚、SILにおいて深層型扁平上皮細胞が検出された症例は1例のみで解析対象となる細胞数が乏しい為、統計学的比較検討からは除外した。

全体及び細胞診判定別の深層型扁平上皮細胞の核面積、細胞面積、N/C比、核形不整の程度、核の濃染性それぞれの平均値(標準偏差)[95%

信頼区間]を Table 1 に示す. また, NILM 及び SCC における代表的細胞像を Fig. 1 に, シェーマを Fig. 2 に示す.

核面積の平均値 (標準偏差)[95 %信頼区間]は NILM: 66.0  $\mu\text{m}^2$  (34.8)[59.9, 72.0], SCC: 82.6  $\mu\text{m}^2$  (43.7)[68.8, 96.3]となり, SCC が高値を示した. 細胞面積は, NILM: 148.6  $\mu\text{m}^2$  (79.0)[134.8, 162.4], SCC: 176.0  $\mu\text{m}^2$  (73.0)[153.1, 198.9]と, SCC が高値を示した. N/C 比は, NILM: 0.47 (0.13)[0.44, 0.49], SCC: 0.48 (0.14)[0.44, 0.53]と, ほぼ同値を呈した.

核形不整の程度は, NILM: 1.25 (0.08)[1.24, 1.27], SCC: 1.29 (0.09)[1.26, 1.32]となり, SCC が高値を示した. 核の濃染性は, NILM: 89.1 (26.3)[84.5, 93.7], SCC: 79.4 (21.1)[72.8, 86.0]となり, SCC が低値を示した.

### 3. 深層型扁平上皮細胞の出現率

NILM-SCC 間 ( $p<0.001$ )と SIL-SCC 間 ( $p<0.001$ )において深層型扁平上皮細胞の出現頻度に有意差が認められた. 深層型扁平上皮細胞が出現した症例のうち解析対象細胞が含まれている症例における深層型扁平上皮細胞の 1 症例あたりの出現個数は, NILM-SCC 間 ( $p=0.972$ )に有意差は認められなかった. 核面積は SCC-NILM 間 ( $p=0.042$ ), 核形不整の程度では SCC-NILM 間 ( $p=0.028$ )に有意差が認められた.

### 4. 核面積及び核形不整の程度の細胞診判定別分布

核面積及び核形不整の程度を細胞診判定別 (NILM, SCC) にプロットしたものを Figs. 3,4 に示す. 核面積のデータ分布は, NILM が低値, SCC はそれより高値に分布が偏っており, NILM では高値を示す外れ値が目立っていた (Fig. 3). 核形不整の程度の分布は, NILM と SCC いずれも広範に分布しており, NILM が低値, SCC は高値に偏っていた (Fig. 4).



Table 1 深層型扁平上皮細胞の細胞形態画像解析結果

Parameters	Cytologic diagnoses			Total
	NILM <sup>*1</sup>	SIL <sup>*2</sup>	SCC <sup>*3</sup>	
Number of cases	22	1	7	30
Number of cells	126	3	39	168
Nuclear area ( $\mu\text{m}^2$ )	M (SD) 66.0 (34.8) 95% CI [59.9, 72.0]	65.2 (9.7) [54.2, 76.2]	82.6 (43.7) [68.8, 96.3]	69.8 (37.5) [64.1, 75.5]
Cellular area ( $\mu\text{m}^2$ )	M (SD) 148.6 (79.0) 95% CI [134.8, 162.4]	112.0 (35.3) [72.1, 152.0]	176.0 (73.0) [153.1, 198.9]	154.3 (78.1) [142.5, 166.1]
N/C ratio	M (SD) 0.47 (0.13) 95% CI [0.44, 0.49]	0.62 (0.14) [0.47, 0.77]	0.48 (0.14) [0.44, 0.53]	0.47 (0.13) [0.45, 0.49]
Nuclear irregularity <sup>*4</sup>	M (SD) 1.25 (0.08) 95% CI [1.24, 1.27]	1.33 (0.03) [1.30, 1.37]	1.29 (0.09) [1.26, 1.32]	1.26 (0.08) [1.25, 1.28]
Hyperchromasia <sup>*5</sup>	M (SD) 89.1 (26.3) 95% CI [84.5, 93.7]	90.7 (17.6) [70.8, 110.6]	79.4 (21.1) [72.8, 86.0]	86.9 (25.4) [83.0, 90.7]

Data form is as follows. Mean (M) (standard deviation (SD)) and 95 % confidence interval (95 % CI).

\*1: NILM means "negative for intraepithelial lesion or malignancy".

\*2: SIL means "squamous intraepithelial lesion or dysplasia".

\*3: SCC means "squamous cell carcinoma".

\*4: Nuclear irregularity based on fractal dimension.

\*5: Hyperchromasia based on image brightness value.

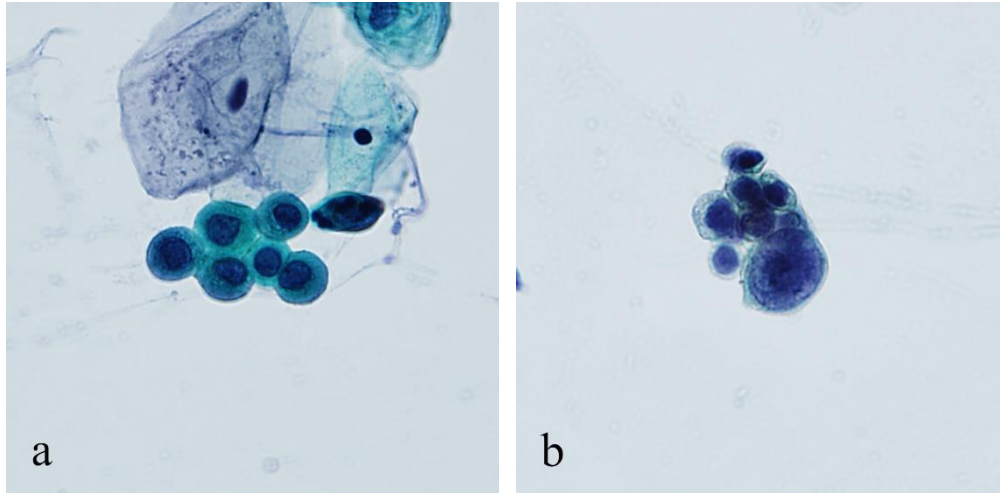
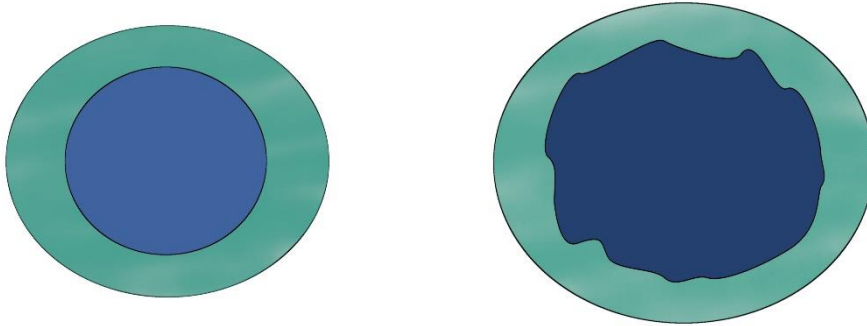


Fig. 1 深層型扁平上皮細胞写真 (従来型塗抹細胞診, Pap,  $\times 40$ ).

a: Deep layer squamous cells in NILM. Nuclear shape with smooth edge and showed unremarkable nuclear.

b: Deep layer squamous cells in SCC. Nuclear is enlargement and rough border.



a

b

Fig. 2 典型的な深層型扁平上皮細胞のシェーマ

a: Regular shape and small nuclear in NILM.

b: Irregular shape and enlargement nuclear in SCC.

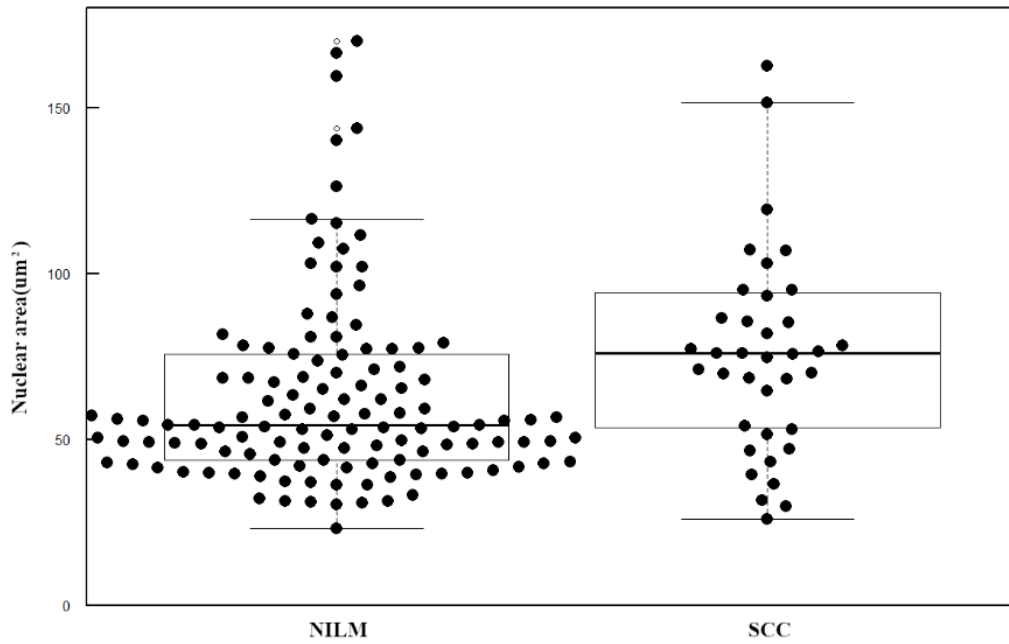


Fig. 3 NILM と SCC 症例に出現した深層型扁平上皮細胞の核面積分布

Nuclear area of deep layers squamous cell by box plot and beeswarm plot.

The distribution range of nuclear area of SCC was higher than that of NILM.

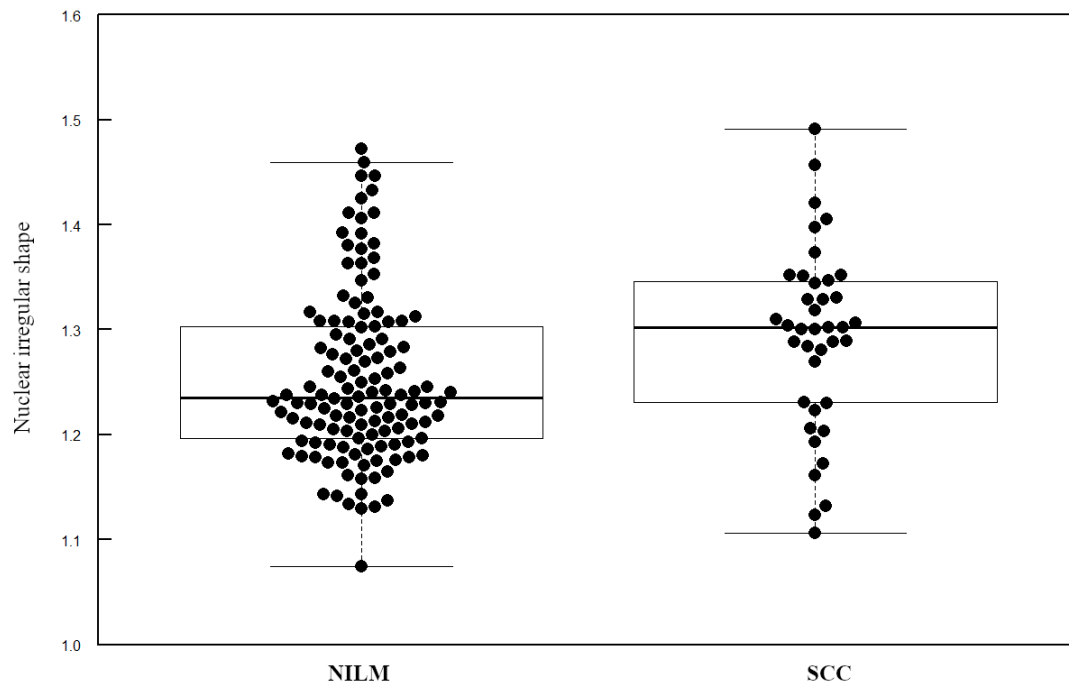


Fig. 4 NILM と SCC 症例に出現した深層型扁平上皮細胞の核形不整

Nuclear irregularity of deep layer squamous cells by box plot and bees warm plot. Though the distribution of nuclear irregularity in NILM and SCC was widely observed SCC was higher than that of NILM.

## 考 察

口腔 EC は生検と比較すると、前癌病変や早期癌の上皮細胞異型がより早期に反映される[22] [23]が、精度管理が不十分であり、LBC の普及によりさらに複雑になっている[24] [25] [26]. 1973 年, Allegra ら [24] は 6,448 症例を含む過去の文献を渉猟し、口腔 EC の感度は 97.3 %と高く、偽陰性はわずかに 2 症例と報告した. 一方で、63.9 % [27] と低い感度の記述も認める. 過去の論文を総括すると、口腔 EC は角化細胞のみからの細胞判定のために正診率への議論が残り、その普及率は高くない [26].

本研究の細胞形態解析では上皮性異形成とその他の病変の間に CVC あるいは LBC による所見の差異は認められなかった. 加えて口腔上皮性異形成のグレードの上昇に伴う核所見の変化が子宮頸部のそれと比較して小さいことが、偽陰性を導く要因である[28]. OSCC の表層型扁平上皮異型細胞については、CVC での核濃染性が有意に上皮性異形成と比較して高いが、LBC では有意差が認められなかった. 本研究では、いずれの標本作製法でも炎症における核所見の変化が他病変と比較して顕著であったことが、精度の低下の一因であると推察された. Kahn [29] は偽陰性の原因は表層細胞のみから採取されることにあり、CVC では組織学的に異形成に到達できないと述べている. 加えて細胞診断を通じて生じる技術的差異が、検鏡時の誤判定に

つながると示している [30]. 一方 LBC は、殊に細胞形態と染色性、そしてきれいな背景という点において有意な優位性が示されている [1] [31] [32]が、LBC 標本でみられる細胞形態の特殊性に関する報告は非常に乏しい. 一方で、子宮頸部研究で臨床的に外向性腫瘍や白板症を呈する場合には、LBC の優位性は認められないとも報告されている[33]. 本研究では、LBC は過角化症の病態であっても明らかに多くの細胞数が観察可能であった. 細胞形態の比較では、各種領域での特に核所見に関する報告が認められる. LBC は、副甲状腺領域では細胞数が多彩で、核形態は類似しているが、核の大きさは小さく、細胞形態は保たれている[14]. リンパ組織では、核と細胞質構造が LBC の方が明瞭である[34]. 口腔領域では LBC の口腔粘膜疾患に対する有用性報告が散見される[15] [16] [17]が、CVC と LBC の細胞形態を比較した研究は非常に乏しい. Sharma ら [35] は、口腔の LBC はきれいな背景に均一の細胞分布からなる一層の塗抹所見であり、核濃染性や 2 核あるいは多核の所見が明瞭であると述べているが、わずか 5 症例のみの標本しか対象としていない. 口腔 EC は精度管理が必要で、そのための CVC と LBC における細胞所見の蓄積は早急の課題と考える. 本研究では LBC の明瞭な細胞分布、形態、染色性が認められた. 加えて、細胞は角質片、表層型扁平上皮細胞、表層型扁平上皮異型細胞あるいは深層型扁平上皮異型細胞のように

重力に従って集団化して出現した。これら2つの特徴は、スクリーニング時に有用であり時間の短縮化に有効であった。一方で、前述のごとく子宮頸部で有用性がみられなかった外向性ないし過角化性病変 [5]に対して、本研究では LBC は過角化症でも有意に豊富な細胞量が認められた。本結果は LBC の導入により、情報量の増加という観点では細胞判定精度は改善されるが、核濃染性が減少するために偽陰性を導く可能性が示唆された。このことから LBC では上皮性異形成の細胞判定に核の染色性を重要視してはならないと推量された。Navone ら [1] は OSCC と口腔潜在的悪性疾患の早期発見に対する LBC と CVC の利点欠点について、CVC もスクリーニングの一助となるが LBC の方が感度及び特異度の向上により良い精度を導くと推察されるが、より研究が必要であると結論づけている。

結論として、口腔粘膜病変における LBC と CVC はいずれも診断手法として信頼性があるが、LBC は検体保存、標本作製の標準化及び細胞観察や再現性において改善された結果が得られた。これは過去の報告[31]と同様の見解であった。一方、LBC での細胞形態学的不利益は、核濃染性の減少であり、LBC に関する精度管理と臨床応用に関する解明が必要である。また本研究で扱った症例数は限られており、この結論にも限界がある。したがって、症例数を増やしてさらなる検討の余地が残された。



口腔細胞診における癌の判定では深層型扁平上皮異型細胞の存在が重視されている[21]ため、本研究では細胞診判定別に特徴を比較検討した。深層型扁平上皮細胞と深層型扁平上皮異型細胞との明確な鑑別基準が存在しないこと、症例選定において組織学的裏付けが伴っていないことに鑑み、本研究では深層型扁平上皮細胞と深層型扁平上皮異型細胞との区別は行わず、それらすべてを深層型扁平上皮細胞として取り扱った。

深層型扁平上皮細胞は、対象症例の 9.4 %に認められ、SIL は 1 例のみであったため、NILM と SCC との検討を主軸に行うこととした。びらんや潰瘍を伴う病変のうち、上皮性腫瘍性病変がみられるものでは、E-cadherin の減弱により細胞同士の接着性が低下し深層型扁平上皮細胞が比較的採取されやすい状態となり、SCC の深層型扁平上皮細胞の出現頻度が高値を示したともものと考えられた[36]。口腔の SIL で観察される過角化や深層での角化異常の随伴[37]が、深層型扁平上皮細胞の出現率が低値であることに関係しているものとする。

細胞所見の大きさに関する細胞異型の要因として、核腫大と N/C 比に着目した。既知の報告では、口腔細胞診における扁平上皮細胞は核面積  $68.5 \pm 31.3 \mu\text{m}^2$ 、細胞面積  $1848.6 \pm 567.5 \mu\text{m}^2$ 、N/C 比換算で 0.0625-0.02 であり、深層にゆくにしたがって細胞形態は小さく円形となり、核の大きさはほぼ

変わらないため、N/C 比は増大するとされている[38]. 従って、深層型扁平上皮細胞を対象とした本研究結果は既知の報告の証左となったと考える. また、細胞診判定別の比較では、核面積及び N/C 比は NILM より SCC で大きい傾向を示し、核面積には有意差を認めた. 核腫大は肺扁平上皮癌の細胞診において、病変の進行に伴い増大することが報告されている[39]. また乳腺においても、良性病変と比較して悪性腫瘍の方が核は腫大するとされる[40]. 本研究においてもこれらの報告に近似する結果となったことから、口腔 EC における核腫大は細胞診判定において考慮すべき一所見であると考えられる. しかし、蜂群図にて NILM では高値を示す外れ値が目立っており、反応性の核腫大については注意が必要である. そして、N/C 比が NILM-SCC 間に有意差を認めなかった理由として、深層型扁平上皮細胞は SCC と細胞質のいずれもが腫大化しており、その結果相対的な値に変化が乏しかったものと推察される. Verma ら[41]は、組織学的診断に基づき口腔 EC の表層型扁平上皮細胞は健常と SCC からランダムサンプリングし、SCC は核面積が高値、細胞面積が低値、N/C 比は高値を示し、それらと健常群との間に有意差を認めたと報告している. 口腔では、1953 年に Slaughter ら[42]が提唱した field cancerization の概念が支持されており、実際の口腔癌でも周囲に異形成病変を伴っている症例は少なくない. 故に、SCC 症例では周囲の異形成病変の

細胞も採取されている可能性があり、その結果、表層型扁平上皮細胞のランダムサンプリングでも差異が生じたものと考えられる。しかし、深層型扁平上皮細胞の N/C 比には有意差を認めなかったことから、細胞異型の有無による差異については別に検討する必要があると考える。

核形不整の程度の解析には、病理組織・細胞形態学的解析研究で散見されるフラクタル解析を用いた[43][44][45]。フラクタル解析では、形態の複雑さを定量評価可能であり、より複雑な形態を示すものは高値を示すとされる[45][46]。本研究では、SCC は NILM と比較して核形不整の程度が有意に高値であり、他臓器における既知の報告[44]と類似していた。従って口腔 EC でも核形不整の程度は細胞判定の一助になり得ることが示された。

核の濃染性については、乳房における良性病変と比較して悪性腫瘍の細胞は、核の明度が低値を示すとされる[40]。本研究結果においても、NILM と比較して SCC の明度は低値を示した。しかし、両者に有意差は認められなかった。SCC では、核クロマチンが増量することが知られている[21]。SCC では核面積が高値を示したことから、核体積も増加している可能性があり、核クロマチンと核体積双方の増加によって、結果として、単位体積あたりのクロマチン量はさほど変化しなかったものと考えられる。加えて、細胞診では、組織診のような断面でなく、深さ方向に積算された像を観察している。また、SCC では細胞骨

格に異常が生じている[47]. 故に, 観察された細胞の核が深さ方向へ歪みを生じていたとすると, 観察時の核の明度が有意に低値を示さなかったことはクロマチン増量を加味しても矛盾しない結果であった.

本結果では, 核面積と核形不整の程度に有意差を認め, 個別の細胞のみで正確な細胞診判定を行うことは困難であることが示されたが, 癌のスクリーニングでは, ひとつひとつの細胞所見を慎重に取り扱う必要があると考える.

## 結 論

本研究の結論は以下の通りである.

- 1) LBC は CVC と比較して有意に多い細胞量が観察された
- 2) 健常以外の全病変で核濃染性は CVC が LBC よりも有意に高値だった。
- 3) 核形不整において, 炎症と OSCC の深層型扁平上皮異型細胞の LBC は CVC よりも有意に高値であった.
- 4) LBC での唯一の細胞判定上の不利益は核濃染性の減少であった.
- 5) 舌縁部から採取された深層型扁平上皮細胞は, NILM (8.6 %)と比較して SCC (40.0 %)の方が高頻度にみられた.
- 6) 深層型扁平上皮細胞の細胞像は, NILM と比較して SCC は核面積が大きく, 複雑な核形態を示すことが明らかとなった.

7) 口腔 EC の深層型扁平上皮細胞の細胞診判定において、核面積と核形不整の程度がスクリーニング時の細胞診判定の一助になる細胞所見であることが示された。

## 総括

総括として、口腔粘膜病変における LBC と CVC はいずれも診断手法として信頼性があるが、LBC は検体保存、標本作製の標準化及び細胞観察や再現性において改善された結果が得られた。一方 LBC での細胞形態学的不利益は、核濃染性の減少であり、LBC に関する精度管理と臨床応用に関する解明が必要である。細胞診断の要点といわれている深層型扁平上皮細胞は、SCC で高頻度に出現していた。細胞診判定別の比較では、核面積及び N/C 比は NILM より SCC で有意に大きく、判定基準の一助となり得ると示唆された。また、本研究で扱った症例数は限られており、症例数を増やしてさらなる検討の余地が残された。

## 参考文献

- [1] Navone, R., Pentenero, M. and Gandolfo, S. (2011) Liquid-based cytology in oral cavity squamous cell cancer. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 19(2), 77-81.
- [2] Franceschi, S., Barzan, L. and Talamini, R. (1997) Screening for cancer of the head and neck: If not now, when? *Oral Oncology*, 33(5), 313-316.
- [3] Taghavi, N., Yazdi, I. (2015) Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concept. *Arch Iran Med*, 18(5), 314-319.
- [4] Smith, J.H.F. (2011) Cytology, liquid-based cytology and automation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(5), 585-596.
- [5] Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T. (2000) Robbins. *Patología estructural y funcional* 6 ed. (Spanish Edition), Madrid : McGraw-Hill Interamericana
- [6] Ogden, G. R. (1997) The future role for oral exfoliative cytology—Bleak or bright? *Oral Oncology*, 33(1), 2-4.
- [7] Dabelsteen, E., Roed-Petersen, B., Smith, C.J. and Pindborg, J.J. (1971)

The limitations of exfoliative cytology for the detection of epithelial atypia in oral leukoplakias. *British Journal of Cancer*, 25(1), 21-24.

[8] Folsom, T.C., White, C.P., Bromer, L., Canby, H.F. and Garrington, G.E. (1972) Oral exfoliative study: Review of the literature and report of a three-year study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 33(1), 61-74.

[9] Diniz-Freitas, M., Garcia-Garcia, A., Crespo-Abelleira, A., Martins-Carneiro, J.L. and Gandara-Rey, J.M. (2004) Applications of exfoliative cytology in the diagnosis of oral cancer. *Medicina Oral: Organo Oficial de la Sociedad Espanola de Medicina Oral y de la Academia Iberoamericana de Patologia y Medicina Bucal*, 9(4), 355-361.

[10] Davey, E., Barratt, A., Irwig, L., Chan, S.F., Macaskill. P., Mannes, P. and Saville, A.M. (2006) Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet*, 367(9505), 122-132.

[11] Payne, N., Chilcott, J. and McGoogan, E. (2000) Liquid-based cytology for cervical screening. *Cytopathology*, 11(6), 469-470.

[12] Singh, V.B., Gupta, N., Nijhawan, R., Srinivasan, R., Suri, V. and

Rajwanshi, A. (2015) Liquid-based cytology versus conventional cytology for evaluation of cervical Pap smears: Experience from the first 1000 split samples. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 58(1), 17-21.

[13] Sahin, D., Yilmazbayhan, D., Firat, P., Hacisalihoglu, U.P., Kirimlioglu, S.H., Celenk, E. and Arslan, R. (2017) Comparison of conventional cytology and SurePath in split thyroid fine needle aspiration materials. *Cytopathology*, 28(4), 291-298.

[14] Park, G.S., Lee, S.H., Jung, S.L. and Jung, C.K. (2015) Liquid-based cytology in the fine needle aspiration of parathyroid lesions: A comparison study with the conventional smear, ThinPrep, and SurePath. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(10), 12160-12168.

[15] Kobayashi, T.K., Ueda, M., Nishino, T., Terasaki, S. and Kameyama, T. (1998) Brush cytology of herpes simplex virus infection in oral mucosa: use of the ThinPrep processor. *Diagnostic Cytopathology*, 18(1), 71-75.

[16] Maksem, J.A. and Weidmann, J. (2001) Specialized preparative devices are not needed for liquid-based, thin-layer cytology: an alternate manual method using a metastable alcoholic gel. *Diagnostic Cytopathology*, 25(4), 262-264.



[17] Mollaoglu, N., Wilson, M. J. and Cowpe, J. G. (2001) Extraction of DNA from oral cytological samples by scraping and smear method suitable for restriction site mutation analysis: a pilot study. *Diagnostic Cytopathology*, 25(2), 83-85.

[18] Jajodia, E., Raphael, V., Shunyu, N.B., Ralte, S., Pala, S. and Jitani, A.K. (2016) Brush cytology and AgNOR in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Acta Cytologica*, 61(1), 62-70.

[19] Kujan, O., Pemberton, M.N., Schwarz, M. and Sloan, P. (2018) Evaluation of an innovative oral brush for potential applications using liquid based cytology. *Journal of Oral Science*, 60(1), 45-50.

[20] Reibel, J., Gale, N., Hille, J, Hunt, J., Lingen, M., Muller, S., Sloan, P., Tilakaratne, W., Westra, W., Williams, M., Vigneswaran, N., Fatani, H., Odell, E. and Zain, R. (2017) Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. In: El-Naggar, A.K., Chan, J.K.C., Grandis, J.R., Takata, T. and Slootweg, P.J., Eds., *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th ed, International agency for research on cancer (IARC), Lyon, 112-115.

[21] 日本臨床細胞学会 (2015) 「細胞診ガイドライン5消化器」 東京:金原出版

- [22] King, O.H.J. and Coleman, S.A. (1965) Analysis of oral exfoliative cytologic accuracy by control biopsy technique, *Acta Cytologica*, 9(5), 351-354.
- [23] Stahl, S.S., Sandler, H.C. and Cahn, L.R. (1964) The significance of dyskaryotic cells in exfoliative cytology. *Acta Cytologica*, 8(1), 73-79.
- [24] Allegra, S.R., Broderick, P.A. and Corvese, N. (1973) Oral cytology. Seven year oral cytology screening program in the State of Rhode Island. Analysis of 6448 cases. *Acta Cytologica*, 17(1), 42-48.
- [25] Dolens, E.S., Nakai, F.V.D., Santos, P., José, L. and Alborghetti, N.G. (2013) Cytopathology: A useful technique for diagnosing oral lesions?: A systematic literature review. *Diagnostic Cytopathology*, 41(6), 505-514.
- [26] Mehrotra, R., Gupta, A., Singh, M. and Ibrahim, R. (2006) Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Molecular Cancer*, 5, 11.
- [27] Mehta, F.S., Daftary, D.K. and Sahiar, B.E. (1970) A correlative histocytological study of epithelial atypia in leukoplakic and submucous fibrosis lesions amongst Indian villagers in a mass screening programme. *Indian Journal of Cancer*. 7(1), 18-23.

- [28] Kuyama, K., Matsumoto, T., Morikawa, M., Fukatsu, A., Ichimura, M., Wakami, M., Fukumoto, M., Kato, T. and Yamamoto, H. (2013) Morphometrical findings among dysplasias of oral, cervical and bronchial regions. *Open Journal of Stomatology*, 3(2), 215-222.
- [29] Kahn, M. A. (2001) Oral exfoliative cytology procedures: conventional, brush biopsy and ThinPrep. *The Journal of the Tennessee Dental Association*, 81(1),17-20.
- [30] Karnon, J., Peters, J., Platt, J., Chilcott, J., McGoogan, E. and Brewer, N. (2004) Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis, *Health Technology Assessment*, 8(20), 1-78.
- [31] Hayama, F.H., Motta, A.C., Silva, A.P.G. and Migliari, D.A. (2005) Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 10(2), 115-122.
- [32] Delavarian, Z., Mohtasham, N., Mosannen-Mozafari, P., Pakfetrat, A., Shakeri, MT. and Ghafoorian-Maddah, R. (2010) Evaluation of the diagnostic value of a Modified Liquid-Based Cytology using OralCDx Brush

in early detection of oral potentially malignant lesions and oral cancer.

*Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 15(5), e671-676.

[33] Osaka, R., Hayashi, K., Onda, T., Shibahara, T. and Matsuzaka, K.

(2019) Evaluation of liquid based cytology for tongue squamous cell carcinoma: Comparison with conventional cytology. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 60(1), 29-37.

[34] Singh, P., Rohilla, M. and Dey, P. (2016) Comparison of liquid-based preparation and conventional smear of fine-needle aspiration cytology of lymph node. *Journal of Cytology*, 33(4), 187-191.

[35] S Sharma, S., Ahluwalia, C., Singh, M. and Mandal, A.K. (2018) Diagnostic utility and efficacy of conventional versus SurePath® Liquid-Based Cytology in head and neck pathology: A study in an Indian Tertiary care Hospital. *Iranian Journal of Pathology*, 13(2), 188-195.

[36] Aoki, T., Kuyama K., Sun Y. A. (2012) A histopathological and immunohistochemical study of cell-cell interactions: With special reference to advance of dysplastic grading. *International Journal of Oral-Medical Sciences*, 10(4), 344-352.

[37] Speight, P.M. (2007) Update on oral epithelial dysplasia and

progression to cancer. *Head and Neck Pathology*, 1(1), 61-66.

[38] 渡辺義男 (1968) 口腔領域における細胞診. *日本臨床細胞学会雑誌*, 7(2), 168-171.

[39] 斎藤 泰紀, 今井 督, 薄田 勝男, 菅間 敬治, 佐川 元保, 永元 則義, 佐藤 雅美, 須田 秀一, 橋本 邦久, 仲田 祐, 佐藤 博俊, 中嶋 隆一郎, 近 京子, 金子 泉, 佐々木 繁子 (1985) 気管支原発早期扁平上皮癌の細胞診断学的検討. *日本臨床細胞学会雑誌*, 24(4), 686-698.

[40] Kashyap, A., Jain, M., Shukla, S., Andley, M. (2017) Study of nuclear morphometry on cytology specimens of benign and malignant breast lesions: A study of 122 cases. *Journal of Cytology*, 34(1), 10-15.

[41] Verma, R., Singh, A., Badni, M., Chandra, A., Gupta, S., Verma, R. (2015) Evaluation of exfoliative cytology in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions: A cytomorphometric analysis. *Dental Research Journal (Isfahan)*, 12(1), 83-88.

[42] Slaughter, D.P., Southwick H.W., Smejkal, W. (1953) Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6(5), 963-968.

[43] Cross, S.S. (1997) Fractals in pathology. *Journal of Pathology*, 182(1),

1-8.

[44] Dey, P., Mohanty, S.K. (2003) Fractal dimensions of breast lesions on cytology smears. *Diagnostic Cytopathology*, 29(3), 85-86.

[45] 佐藤明人 (2005) 大腸上皮性腫瘍腺口形態(pit pattern)のフラクタル解析: pit pattern の定量評価と病理組織診断との対比. *新潟医学会雑誌*, 119(8), 464-473.

[46] 高安秀樹 (1986) 「フラクタル」 東京:金原出版

[47] Saunders, W.S., Shuster, M., Huang, X., Gharaibeh, B., Enyenihi, A.H., Petersen, I., Gollin, S.M. (2000) Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(1), 303-308.

