口腔病変の臨床的悪性度の指標について

第1報 口腔扁平上皮癌ならびに前癌性病変の核 DNA 量と核面積を中心にして

木下 鞆彦・志村 介三・藤原由直・本間義郎
井上 聡・下里 誠・桐ヶ久保光弘・浅野 信雄
水谷成孝・佐藤 倫一・高柳 茂

Study on the index for the degree of clinical malignancy in oral lesion

I. Nuclear DNA content and nuclear area in squamous cell carcinoma and precancer

Yukihiko KINOSHITA · Kaizo SHIMURA · Yoshinao FUJIWARA · Yoshiro HONMA
Satoshi INOUE · Makoto SHIMOZATO · Mituhiro KIRIGAKUBO · Nobuo ASANO
Naritaka MIZUTANI · Tomoichi SATO · Shigeru TAKAYANAGI

Abstract: This study was performed to obtain the index for the clinical malignancy of oral cancers as well as that for the potential of malignant change in oral precancerous lesions by analysing the nuclear DNA content and nuclear area and examining the relationship of these parameters to the clinical and pathological findings.

Subjects enrolled in this study were consisted of 57 cases of oral squamous cell carcinoma, 13 cases of leukoplakia, 10 cases of verrucous hyperplasia and 6 cases of normal oral mucosa. Cell samples were obtained by smear and imprint in general but isolated from thick paraffin sections of biopsy specimens in some cases as occasion demanded. The nuclear DNA content and nuclear area were simultaneously determined by Vickers M 86 scanning microdensitometer after Feulgen staining. The nuclear DNA content of epithelial cells was calculated referring that of lymphocyte as control to be 2.0 C.

The results were summarized as follows:

1. The DNA histogram revealed that the normal oral mucosa had a high, distinct peak at 1.5-2.0 C. Cells over 4.0 C were not observed. The nuclear area was approximately $40 \mu^2$.
2. In the case of squamous cell carcinoma, the variations of nuclear DNA content and nuclear area became larger with the increased values of them, however, the variation by individual cases was also large. Patients with rapid progress of tumorigenesis and high degree of histological atypia had increased average values of nuclear DNA content and its variance, high frequency of cells over 4.0 C, and enhanced variance of nuclear area. In addition, patients with 2 peaks or more in the DNA histogram or those with high correlation of nuclear DNA content to nuclear area were apt to have poor prognosis.
3. The nuclear DNA content and nuclear area in cells from cases of papilloma or leukoplakia with simple hyperkeratinization were the same as normal mucosa or else increased slightly. However, the average nuclear DNA content and its variance, frequency of cells more than

神奈川歯科大学口腔外科学教室

(主任：志村介三教授)

Department of oral surgery, Kanagawa Dental
College (Chief: Prof. Kaizo Shimura)

受付日：昭和58年11月10日

4.0 C, distributions of nuclear DNA content and nuclear area in cells from suspected malignant verrucous lesion and leukoplakia accompanying carcinogenesis in part resembled to those of squamous cell carcinoma.

From these findings mentioned above, determinations of the nuclear DNA content and nuclear area of cells from oral cancers and oral precancerous lesions seem to have an important significance in the evaluation of clinical malignancy and malignant potential.

Key words: nuclear DNA content, nuclear area, oral squamous cell carcinoma

I. 緒 言

口腔の悪性腫瘍、前癌性病変は多様な病態像を呈するが、これらの臨床的悪性度や悪性潜在能を的確に把握することは治療方針の決定ならびに予後判断にきわめて重要である。

この目的のために従来より臨床型や組織所見、最近では各種の免疫パラメーターなど各面から検討されているが、個々の症例についてみると、これらの所見と臨床経過との関連性が明確でないことも多い。したがって、より病変の生物学的性状を反映した、客観的臨床評価の基準の確立が要請される。

一方、核 DNA は細胞の増殖や遺伝情報の担い手として細胞機能の中心的役割を果たす生体物質である。正常細胞では染色体一組ごとに一定の核 DNA 量を持ち、細胞分裂の際にも DNA 量は常に一定性を保っているが、自律的細胞増殖と異常分裂を特徴とする癌細胞において

は、核 DNA 量が種々に変化することは、近年の顕微測光法の発展とともに次第に明らかにされつつある。そして悪性、ないし増殖性病変における核 DNA 量の変化の様相は細胞増殖活性や染色体異常に基づく cell population などと関連し、病変の生物学的性状を解明するうえで有力な情報を提供するものと考えられる。しかし、口腔領域におけるこのような観点からの系統的な研究結果は乏しい。本報告はまず、口腔扁平上皮癌、次いで白板症、疣贅状増殖病変などの前癌性病変の核 DNA 量、核面積の解析を行い、これらと臨床、病理像との関連性を追求した。

II. 材料および方法

1. 検索症例

検索した症例は昭和50年11月から昭和57年11月までの間に、神奈川歯科大学口腔外科学教室にて診断、治療を行った口腔扁平上皮癌57例（ただし口腔症状を呈した洞

図 1 核 DNA 量と核面積の測定方法

図2 正常口腔粘膜上皮の核 DNA 量ヒストグラム (22歳, 男性)

表1 正常口腔粘膜上皮の核 DNA 量と核面積

部位	核DNA量, 核面積	核DNA量平均値	核面積平均値
頬粘膜		1.65C	43.5 μ^2
歯肉		1.67C	42.9 μ^2
舌		1.46C	39.6 μ^2

性癌を含む)と白板症13例, 疣贅状増殖病変11例である。

扁平上皮癌の原発部位は舌23例, 下顎歯肉, 上顎洞各11例, 上顎歯肉5例, 頬粘膜4例, 口腔底3例である。またこれらの臨床進展度 (1978年 UICC 案, 1977年上顎洞癌 JJC 案) は T_1 が7例, T_2 が23例, T_3 が26例, T_4 が1例であり, N_0 が24例, N_1 が23例, N_2 が4例, N_3 が6例である。

2. 検索方法

核 DNA 量測定のための腫瘍細胞の採取方法は通常, 生検材料からの捺印あるいは原発巣からの擦過によったが, 必要に応じ岩佐の方法¹⁾に準じて組織厚切り切片から腫瘍細胞を解離した(図1)。とくに白板症, 疣贅状病変はすべて後者の方法によった。本法は試験切除片を10%緩衝ホルマリン液で固定後, パラフィン包埋したブロックから4 μ の光顕観察用切片と30~50 μ の厚切り切片を作製する。この厚切り切片にヘマトキシリン単染色を施し, 実体顕微鏡下で癌巣あるいは病変部を周囲組織から切り出し, これを2.0% 2Na-EDTA 加0.2M 磷酸緩衝生理食塩水 (pH 7.3) で37.0°C, 2時間作用させる。次いで生理食塩水にて2000 rpm で5分間の遠沈を3回行い洗浄後, 沈渣に crude stembromelain 0.01% と Cystein 0.01M を含む0.2M 磷酸緩衝生理食塩水 (pH 7.5) を37.0°C, 120分間作用させる。遠沈, 洗浄を行った後, 500 KW 25 KC の超音波に30分間作用させ, 1分間静置後, 上清液を取り出し, これを900 rpm で5分間の遠沈を数回繰り返す。最後に沈渣に1%卵白グリセリン水溶液を加え, 細胞浮遊液としてスライドガラスに塗抹する。

核 DNA の染色には Feulgen 反応を行うが, 加水分解は1N HCl にて60°C, 5分間, Schiff 液は18°C, 30分間作用させた。

核 DNA 量の測定は, Pana Facom C-15 personal computer を接続した Vickers M 86 走査型顕微鏡濃度計を使用し, scanning method により行った。測光条件は倍率10×40, 測光スポット1 μ , 波長は Feulgen 染色の最大吸光度を示す560 nm とした。以上の条件で細胞の形態を確認しつつ, 1症例につき細胞100個の核 DNA の光学濃度を測定した。同時に, 同一条件下で染色した20~40個の末梢血リンパ球または組織内リンパ球 (パラフィン切片からの細胞解離を行った場合) の核 DNA 量を測定し, その平均値を2Cとして腫瘍細胞の核 DNA 量を算出した。得られた値より核 DNA 量ヒストグラムを作製するとともにその統計的処理を行った。また54年度以後の症例については測光 area から核面積を同時に算出して, 核 DNA 量と核面積の散布図 (以後単に散布図と略す) を作製し両者の相関性を検索した。さらに対照として20~26歳の健康口腔粘膜6例16部位の核 DNA 量, 核面積について同様に検索した。

III. 結 果

1. 正常粘膜上皮について

核 DNA 量は部位により多少の相違がみられ, 舌では頬, 歯肉にくらべやや小さい(表1)。しかし核 DNA 量ヒストグラムはいずれの部位も1.5~2.0Cに高い peak を持つ単峰型を呈し(図2), 核 DNA 量平均値は1.4~2.0C, 分散は0.04~0.12の範囲内にあり, 4C 以上の高倍体細胞は認められなかった。

核面積はおよそ40 μ^2 前後に限局し, その平均値は舌で39.6 μ^2 , 歯肉で42.9 μ^2 , 頬粘膜で43.5 μ^2 であり, 核面積の分散は最低17.2, 最高91.0であった。

2. 扁平上皮癌について

正常粘膜上皮に比べ核 DNA 量の変動が大きく, 症例間にもかなり相違が認められ, 最低1.1C, 最高値は32C

図 3 正常口腔粘膜上皮および各病変の核 DNA 量

図 4 扁平上皮癌の核 DNA 量ヒストグラム

であった。

各症例ごとの核 DNA 量の平均値は2.3～5.4 Cで、全体の平均は3.40であり、核 DNA 量の分散は0.45～7.2でその平均は1.98で、いずれも正常値より高値を示した(図3)。また4 C 以上の細胞の出現頻度は5～80%で、その平均は26%であった。

核 DNA 量ヒストグラムは全般に peak の低下と aneuploid (異数倍性)、あるいは polyploid (多倍数性)

の傾向がみられる。しかしヒストグラムパターンは非常に多彩で、全体の形から単峰型、2峰型、多峰型に、また modal C value (最頻度C値) の位置によりそれぞれ2 C域の mode I 型、3C域の mode II 型、4C 以上あるいは不明瞭な mode III 型に類別された(図4)。おのおの頻度は単峰型が20例(35.1%)、2峰型が16例(28.1%)、多峰型が21例(36.8%)であり、また mode I 型は26例(45.6%)、mode II 型は19例(33.3%)、mode III 型

は12例(21.2%)であった。

核面積は正常粘膜上皮よりも全般的に大きく、同一症例内、さらに症例間においても変動が大である。症例ごとの核面積平均値の最低は46 μ^2 、最高は180 μ^2 であり、分散の最小は70、最大は4806であった(図5)。核面積と核DNA量との関係を見ると、核面積の大きい核は概して核DNA量も大きい、両者の相関性の強さはさまざま

図5 正常口腔粘膜上皮および各病変の核面積

まであり、散布図から図6のごとく4型に類別された。散布図Ⅰ型は核DNA量、核面積とも比較的分散が小さい型、散布図Ⅱ型は低倍体で核面積の小さい集団と高倍体で核面積の大きい細胞集団に分かれる型、散布図Ⅲ型は核DNA量、核面積の分散の大きい型、散布図Ⅳ型は両者の相関性が非常に強い型であり、各型の頻度はそれぞれ8例(19.5%)、5例(12.2%)、16例(39.0%)、12例(29.3%)であった。

以上の結果と組織像との関係を見ると、異型性と核DNA量、核面積との間にかなり高い相関性が認められた。すなわち異型性が軽度のものから中等度、高度になるに従い(写真1)核DNA量の平均値、分散、4C以上の細胞頻度が大きくなる傾向で、各異型度間には危険率5%以下で統計的に有為の差が認められた(図7)。また異型性が高くなるに従い核DNAヒストグラムパターンは2峰型ないし多峰型が多くなり、modal C valueは高倍体に移行し、核DNA量と核面積の相関性が高くなる傾向が認められた(表2~4)。分化度と核DNA量との間では異型度にみられるほどの高い相関性は認められなかった(図8)。

核DNA量と臨床進展度との関係を見ると、腫瘍が大きいほど、概して核DNA量の平均値、分散、4C以上の細胞頻度は増加する傾向であるが、同じTカテゴリーでもかなりバラツキがみられた(図9)。頸部リンパ節転移との関係ではヒストグラムパターンの2峰型、多峰型のものや散布図Ⅳ型は他のものにくらべ初診時N陽性群が

図6 扁平上皮癌の核DNA量・核面積散布図

写真 1 扁平上皮癌組織像 (H-E 染色, ×80). A : 分化度高度, 異型性比較的軽度 B : 分化度中等度, 異型性中等度 C : 分化度低く, 異型性高度

多く (表 5, 6), とくに N₃ は 6 例中 4 例が多峰型で, また散布図ではⅣ型のみに N₃ が認められた.

予後成績との関係をみると図 10~12 のように, 核 DNA ヒストグラムパターンでは mode Ⅲ型と多峰型, 散布図ではⅣ型が最も予後が悪く, 累積 5 年生存率はそれぞれ 48%, 49%, 36% であり, 早期死亡例が多かった.

3. 白板症について

各検索症例は表 7 に示した. 部位別では歯肉が 7 例, 舌が 4 例, 口腔底が 2 例であった. 組織学的には単純な過角化を呈するものから中等度の上皮異形成を示すものまで認められ, また症例 68 は広汎な白板症様病変の一部に初期浸潤癌を伴っていた.

核 DNA 量ヒストグラムは 1.5C~2.5C の範囲に modal C value をもち, いずれも単峰型を呈するが, 正常口腔粘膜上皮と同様に peak の高い単峰型 (症例 58, 59, 62) と peak の低い単峰型を示すもの (症例 60, 61, 63~66), さらに polyploid の傾向が明らかなもの (症例 67~70) が認められた (図 13). 核 DNA 量の平均値は 1.54~2.52C に分布し, その平均は 2.4C であり, 正常口腔粘膜上皮の上限 2.0C を越えるものは 10 例 (77%), 扁平上皮癌の下限 2.3C を越えるものは 4 例 (31%) であった (図 3). 核 DNA 量の分散は 0.07~0.64 にわ

表 2 ヒストグラム型と異型性との関係

ヒストグラム型	単峰型	2 峰型	多峰型	計
異型性				
軽 度	11(55 %)	7(35 %)	2(10 %)	20(100%)
中等度	8(25.8%)	8(25.8%)	15(48.4%)	31(100%)
高 度	1(16.7%)	1(16.7%)	4(66.7%)	6(100%)

表 3 mode 型と異型性との関係

mode 型	mode I 型	mode II 型	mode III 型	計
異型性				
軽 度	12(60 %)	7(35 %)	1 (5 %)	20(100%)
中等度	12(38.7%)	11(35.5%)	8(25.8%)	31(100%)
高 度	2(33.3%)	1(16.7%)	3(50 %)	6(100%)

表 4 核 DNA 量・核面積散布図と異型性との関係

散布図	I 型	II 型	III 型	IV 型	計
異型性					
軽 度	4(28.6%)	3(21.4%)	5(35.7%)	2(14.3%)	14(100%)
中等度	4(16.7%)	1 (4.2%)	11(45.8%)	8(33.3%)	24(100%)
高 度	0(0 %)	1(33.3%)	0(0 %)	2(66.7%)	3(100%)

表 5 ヒストグラム型と頸部リンパ節転移との関係

ヒストグラム型 Nカテゴリー	単峰型	2峰型	多峰型
N 0	11(50 %)	5(31.3%)	8(38.1%)
N 1	9(40.1%)	9(56.3%)	7(33.3%)
N 2	1(4.5%)	1(6.3%)	2(9.5%)
N 3	1(4.5%)	1(6.3%)	4(19.0%)
計	22(100 %)	16(100 %)	21(100 %)

表 6 核 DNA 量・核面積散布図と頸部リンパ節転移との関係

散布図 Nカテゴリー	I 型	II 型	III 型	IV 型
N 0	6(75 %)	1(20 %)	8(50 %)	5(41.7%)
N 1	1(12.5%)	3(60 %)	7(43.8%)	4(33.3%)
N 2	1(12.5%)	1(20 %)	1(6.3%)	—
N 3	—	—	—	3(25 %)
計	8(100 %)	5(100 %)	16(100 %)	12(100 %)

図 7 扁平上皮癌の異型性と核 DNA 量

図 8 扁平上皮癌の分化度と核 DNA 量

図 9 原発腫瘍の大きさと核 DNA 量

図 10 扁平上皮癌の核 DNA 量 mode 型と累積生存率との関係

図 11 扁平上皮癌の核 DNA 量ヒストグラム型と累積生存率との関係

たり、その平均は0.32であり、正常口腔粘膜上皮の上限0.12を越えるものは10例(77%)、扁平上皮癌の下限0.45を越えるものは3例(23%)であった。また4C以上の細胞が認められたものは7例(53.8%)であり、そのうち扁平上皮癌の下限5%を越えたものは2例(15.4%)であった。症例ごとの核面積の平均値は正常口腔粘膜上皮のそれとあまり変わらないが分散は大きくなり、8例が扁平上皮癌の下限値を越えていた(図5、表7)。

以上の所見と組織像(写真2)との関係を見ると、上皮異形成のほとんど認められないものでは、核DNA量ヒストグラムパターンは正常口腔粘膜上皮に類似し、核

DNA量の分散は小さく、4C以上の細胞はほとんど認められず、核面積の分散も小さい傾向である。一方、上皮異形成を示すものは概して核DNA量ヒストグラムのpeakの低下、核DNA量の平均値、分散、4C以上の細胞の増加がみられ、同時に核面積の分散も大きくなっている。とくに症例68の白板症部では組織学的に錯角化と軽度の異形成を示すにすぎなかったが、核DNA量の平均値は2.36、分散は0.63、4C以上の細胞頻度は7%、核面積の平均値は47.5 μ^2 、その分散は236で、いずれの数値も扁平上皮癌の下限値を越えており、散布図でも

表 7 白板症の核 DNA と核面積

症例 No	性	年齢	部 位	* 組織異形成	核 DNA 量					核 面 積	
					modal C	**ピーク高 %	平均値	分 散	4C ≤ %	平均値μ ²	分 散
58	男	65	口腔底	(-)	2.0~2.5C	65%	2.18C	0.07	0%	—	—
59	男	49	歯 肉	(-)	2.0~2.5C	51%	1.89C	0.06	0%	—	—
60	女	62	舌	(-)	1.5~2.0C	44%	1.54C	0.11	0%	—	—
61	女	51	舌	(-)	1.5~2.0C	40%	1.81C	0.34	0%	38.5μ ²	132
62	男	72	歯 肉	(-)	2.0~2.5C	70%	2.1C	0.16	0%	27.5μ ²	64.1
63	男	72	歯 肉	(-)	2.0~2.5C	56%	2.24C	0.25	0%	48.9μ ²	91.5
64	男	48	舌	(-)	2.0~2.5C	46%	2.14C	0.20	1%	43.9μ ²	70.1
65	男	48	歯 肉	(-)	2.0~2.5C	47%	2.50C	0.40	1%	37.5μ ²	136.8
66	女	78	舌	(+)	1.5~2.0C	34%	2.03C	0.41	1%	49.5μ ²	405
67	男	40	歯 肉	(+)	2.0~2.5C	36%	2.52C	0.50	4%	62.5μ ²	402
68	男	77	口腔底	(+)	2.0~2.5C	33%	2.36C	0.63	7%	47.5μ ²	236
69	女	58	歯 肉	(+)	2.0~2.5C	47%	2.33C	0.64	5%	42.7μ ²	126
70	男	45	歯 肉	(±)	2.0~2.5C	51%	2.22C	0.36	4%	45.4μ ²	61.0

* (-)異形成なし (+)異形成軽度 (++)異形成中等度

** ピーク高は核 DNA 量ヒストグラムのピークの高さ(%)を示す

図 12 扁平上皮癌の核 DNA 量・核面積散布図と累積生存率との関係

Ⅲ型を呈し、相関性が比較的高く、癌化部では以上の所見がさらに著明に認められた (図14)。本症例は癌化部周辺の白板症様病変部も含めて切除し、4年後、再発なく、経過良好である。

4. 疣贅状増殖病変

各検索症例は表 8 に示した。部位別では口蓋 3 例、頬、舌が各 2 例、口底、歯肉、上嘴唇が各 1 例であった。組織

学的診断は乳頭腫(写真 3A) 6 例、いわゆる verrucous hyperplasia^{2,3)}に相当する上皮過形成(写真 3B)が 3 例、本症の 1 部に初期浸潤癌を伴ったもの(写真 3C)が 1 例であった。

核 DNA 量ヒストグラムは 2.0~2.5 C に modal C value をもつ peak の高い単峰型を呈するものが多いが、症例 79, 80 は他の症例にくらべ、peak の低い、幅広い単峰型を呈した (図15)。症例ごとの核 DNA 量平均値、分散は概して正常口腔粘膜上皮より高いが、症例 79 はおのおの 3.1, 1.3 と最も高く、扁平上皮癌の下限をはるかに越えている(図 3)。本症例は上皮の高度の疣贅状増殖と軽度ないし中等度の細胞異型(写真 4A, B)が認められ、verrucous carcinoma との鑑別が問題となったが上皮脚の結合組織内深部への増殖が明らかでなく、組織学的には verrucous hyperplasia と診断された。4C 以上の細胞はほとんどの症例にみられるが、扁平上皮癌の下限 5% を越えるものは症例 71 の乳頭腫と症例 77, 79 の verrucous hyperplasia の 3 例で、おのおの 6, 8, 22%であった。

核面積の平均値はほとんど、正常範囲内に認められるが、やや分散が高く、核の大小、不揃いがみられた。

また症例 79 の散布図はⅢ型を呈し(図16)、相関係数 0.7 とかなり高く、上述の核 DNA 量所見からも単なる良性病変とは考え難く、悪性に準じた処置を行った。すなわち Ra 針 80 Gy の組織内照射を行い、3 年後、再発なく経過順調である。

表 8 疣贅状増殖性病変の核 DNA 量と核面積

症例 No	性	年齢	部 位	組織診断	核 DNA 量					核 面 積	
					modal C	ピーク高 %	平均値	分 散	4C≤%	平均値μ ²	分散
71	男	64	軟口蓋	乳 頭 腫	2.0~2.5C	62%	2.2C	0.16	0%	29.6μ ²	74.0
72	女	45	舌	乳 頭 腫	2.0~2.5C	71%	2.5C	0.37	6%	38.5μ ²	130.5
73	男	27	口 唇	乳 頭 腫	2.0~2.5C	79%	2.3C	0.20	1%	43.3μ ²	95.3
74	女	24	歯 肉	乳 頭 腫	2.0~2.5C	72%	2.2C	0.30	4%	41.5μ ²	67.0
75	男	79	頬	乳 頭 腫	1.5~2.0C	78%	2.0C	0.30	2%	36.0μ ²	77.1
76	男	47	口 蓋	乳 頭 腫	2.0~2.5C	66%	2.4C	0.21	3%	37.5μ ²	85.5
77	男	31	口 蓋	*V.H.	2.0~2.5C	77%	2.5C	0.41	8%	30.5μ ²	62.3
78	男	74	舌	V.H.	2.0~2.5C	70%	2.4C	0.18	3%	22.1μ ²	36.4
79	女	62	頬	V.H. 細胞異型伴う	2.0~2.5C	45%	3.1C	1.3	22%	37.2μ ²	81.1
80	男	54	口腔底	V.H. 一部初期浸潤癌	2.0~2.5C	45%	2.4C	0.35	2%	37.5μ ²	63.5

* V.H.: verrucous hyperplasia

図 13 白板症の核 DNA 量ヒストグラム

図 14 症例68の核 DNA 量ヒストグラムと核 DNA 量・核面積散布図

IV. 考 察

1. 正常口腔粘膜上皮について

Feulgen 反応は核 DNA 量と定量的に反応し、顕微分光測光による測定値は遺伝子の担体である染色体数に比較的比例し、生化学的な測定結果ともよく一致することが確かめられている⁴⁾。また同一の動物であれば核 DNA 量が恒常性を示すこと (constancy theory) も一般に認められているところである。理論上、正常細胞の核 DNA 量は diploid、すなわち 2C として示され、細胞分裂時には倍加し 4C となる。これまで種々の臓器の核 DNA 量が顕微分光測光により測定されているが⁵⁻²¹⁾、正常組織の核 DNA 量分布はほとんどが 2C 値に分布し、わずかながら 2~4C の細胞がみられるにすぎない。本研究における正常口腔粘膜上皮の核 DNA 量分布はリンパ球を基準とすると分散のきわめて小さい単峰性

写真 2 白板症組織像(H-E 染色, $\times 100$). A: 症例58, 異形成は認められない B: 症例64, 異形成軽度 C: 症例67, 異形成中等度

のヒストグラムを示したが、核 DNA 量平均値は諸家の報告にくらべやや低く、とくに角化の比較強い舌では最も低い値を示した。小倉²²⁾は皮膚の核 DNA 量の生化学的定量により深層から表層の角質層に向かうに従い核 DNA 量は減少すると述べており、今回の測定結果と対比すると興味深い。口腔粘膜上皮の核の大小は一般に核の短径と長径の積で示されるが^{10,23)}、核面積の実測値を求めた報告は少ない。本研究の走査顕微分光測光法は核 DNA 量と同時に核面積を測定できるもので、これによ

写真 3 疣贅状増殖病変の組織像(H-E 染色, $\times 32$). A: 症例71, 乳頭腫 B: 症例78, verrucous hyperplasia C: 症例80, verrucous hyperplasia の一部に初期浸潤癌を伴う

ると正常粘膜上皮細胞の核面積値はおおよそ $30 \sim 50 \mu^2$ に分布し、その平均は $40 \mu^2$ であり、これらの測定値は核の大きさの変化に対する具体的基準となり得ると思われる。

2. 口腔扁平上皮癌について

悪性腫瘍の核 DNA 量の分布が正常組織のそれとは明らかに異なることは Atkin ら⁸⁾ の報告以来、多くの研究者によって指摘されている^{1,7,8,12,18,23-46)}。その特徴的所見として、核 DNA 量の増加、大きな分散、aneuploid

図 15 疣贅状増殖病変の核 DNA 量ヒストグラム

写真 4 症例79の口腔内所見(A)と同組織像(B)
(H-E 染色, $\times 32$)

図 16 症例79の核 DNA 量・核面積散布図

ないし polyploid 細胞の出現, 核 DNA 量ヒストグラムに異常な modal C value の異常などが認められている。しかし, それらの具体的な変化の範囲や, その臨床, 病理学的な意義に関しては種々議論がある。

aneuploid, polyploid 細胞の出現について Sandritter ら²⁵⁾は肺, 子宮頸部, 直腸の癌で 3C 以上の細胞が全例とも13%を越えたとし, これを悪性腫瘍の判定基準とし

て重視しているが, 一方, Razzaq ら²⁷⁾は正常組織ではほとんど認めることない 4C 以上の高倍体細胞の出現頻度を重視し, 大腸癌のそれは 6.8%以上であったと述べ, 同様に岩佐¹⁾, 広瀬²⁸⁾は胃癌で 5% 以上, 花輪¹⁴⁾は大腸癌と胃癌でおのおの 5.0%, 5.8% 以上, 中村¹²⁾, Harada ら¹⁸⁾は子宮頸癌でそれぞれ 95.2%, 32.9% 以上, 堀口³⁵⁾は上顎洞癌で 10% 以上, 小中³⁸⁾は乳癌で 13.5%以上, また三谷⁴⁵⁾は卵巣癌で 50%であったとし, 報告者によって, 結果もさまざまである。これは部位, 組織型などの違いにもよるが, これらの報告のなかには組織切片上で核 DNA 量を測定したものもあるなど, 測定精度上の問題も無視できない。本研究では個々の細胞の核 DNA 全量をできるだけ正確に測定するために, 捺

印、擦過、ないし細胞解離により単離細胞とした。その結果、4C以上の細胞頻度は最低5%で、同様の方法で検索した岩佐¹⁾、花輪¹⁴⁾の結果と一致していた。しかし、その最高は80%に達し症例によるバラツキも大きく、これは口腔扁平上皮癌の細胞生物学的な多様性を反映しているものと思われる。これらaneuploidないしpolyploid細胞の出現は、正常細胞とは異なった遺伝子構造をもった細胞の発生¹³⁾や異常な細胞増殖による核DNAの増加^{8,13)}、分裂異常による染色体数の増加と、そのstem cell化など^{29,31,34)}がその理由としてあげられる。

したがってこれらの細胞の出現頻度は核DNA量の平均値、分散などの統計値とともに口腔扁平上皮癌の具体的な判定基準の指標として意義をもつと思われる。

modal C valueはstem line-cell (種属細胞群)すなわち腫瘍の分裂、増殖の主体をなす細胞群のG₀, G₁期の核DNA量を示すと考えられる^{6,31)}。多くの悪性腫瘍において、modal C valueの異数倍化や右方偏位、すなわち高2C域、3C域、4C域への偏位^{1,6,19,24,26,30,37,40,43,46)}、あるいはmodal C valueのpeakの扁平化、不明瞭化^{1,12,33)}などが認められており、また、原発部によるmodal C valueの特徴を認めるものもある^{12,14,19,24,30,31)}。本研究ではmodal C valueが正常と変わらない2C域のもの、3C域のもの、不明のものなどさまざま、modal C valueだけでは必ずしも良、悪性の判定基準にはならないが、少なくとも異常なmodal C valueは口腔扁平上皮癌の診断的意義をもつものと考えられる。

また悪性腫瘍において核DNA量分布のヒストグラムのボタンが多様性に富むことは、多くの報告者によって認められている^{5,17,19,29,33,37,38,40,41,43,44)}。本研究でも、peakの低い単峰型、明らかな2峰型、多峰型のものまで多彩である。単峰型に著しいpeakの低下は合成期細胞の増加、あるいはmodal C valueに近い核DNA量をもつ種属細胞の存在、が推測される。また2峰型では第1番目のpeakはstem line-cellを示し、第2番目のpeakは前者のおよそ2倍の核DNA量を有することから、G₂, M期の細胞群に相当し、第1peakと第2peak間の細胞は大部分が合成期の細胞と考えられる。さらに多峰型はstem line-cellの複数化やS, G₂, M期細胞の増加が推測される。

核の増大、大小不揃いは扁平上皮癌の一般的特徴だが、本研究における核面積の変動幅、平均値、分散などの統計値はこれらの特徴を具体的、客観的に表現するものと思われる。

核DNA量と核面積の関係について言及した報告は少なく、症例数の少ないことや組織型の相違などもあり見解の一致をみていない^{7,10,23,26,29,44,47,48)}。本研究の扁平上皮癌例では、核DNA量の大きい核は概して核面積の大きいものが多い傾向だが、その相関性は散布図にみる

ごとく多彩であり、個々の細胞についてみると必ずしも平行関係にないものが認められる。下里¹⁰⁾、Pfizer^{ら²⁹⁾}の口腔扁平上皮癌、Levi^{ら⁴⁷⁾}の膀胱の移行上皮癌に同様の結果が見い出される。

核DNA量と病理組織像との関連性についてはOjima^{ら⁴⁹⁾}、Inui^{ら⁵⁰⁾}、Wiendl^{ら⁵¹⁾}は胃癌で核DNA量と病理組織学的特性とは全く関係がないと報告し、三谷⁴⁵⁾も卵巣悪性腫瘍の分化度と核DNA量との間に関連性を認めていない。しかし那須⁷⁾は肝癌で4C値の多い症例は成熟度が低いとしBöhm^{ら³¹⁾}は結腸、子宮の腺癌および腎癌の分化型は2C-3Cにstem lineをもち、規則的倍数性のpeakを示すが低分化型ではstem lineは4C以上ないし不明瞭化すると述べ、小中³⁸⁾、Fu^{ら⁴⁶⁾}、Levi^{ら⁴⁷⁾}もそれぞれ乳癌、膀胱癌、子宮頸部癌で分化度が低くなるにつれてmodal C valueの高倍体化ないし異数倍化がみられると報告している。また岩佐¹⁾、花輪¹⁴⁾、佐々木功典^{ら⁴⁴⁾}は胃癌あるいは大腸癌で核DNA量、ヒストグラムの分散は異型性と関連することを認めている。以上のごとく癌細胞の核DNA量と病理組織像との関係については多くの研究者が関心を示しているが、口腔扁平上皮癌における系統的研究は少なく、十分な検索はなされていない。

本研究では核DNA量は分化度よりはむしろ異型性との間に関連性が強く、異型性が高くなるほど核DNA量の増加、高倍体細胞の出現、分散の拡大が認められ、核DNA量ヒストグラムの多峰化、modal C valueの右方偏位がみられ、また核DNA量・核面積の相関性が高くなる傾向がみられた。すなわち口腔扁平上皮癌の核DNA量の平均値、分散、4C以上の細胞頻度の統計値、ヒストグラムのボタン、核DNA量・核面積の散布図は本症の組織学的異型性を呈示し、その指標として意義をもつものと思われる。

核DNA量と臨床的進展度との関係については、Levi^{ら⁴⁷⁾}は膀胱癌で、初め2倍体のmodal C valueをもつが、進行するに従い低4倍体から異数倍数化すると述べ、Fu^{ら⁴⁶⁾}も同様の傾向を報告し、また佐々木攻^{ら⁴³⁾}は表在性胃癌では2Cにmodeを有し、分散が小さいが、深在性胃癌ではpeakを欠き分散が大きくなるとし、尾崎^{ら¹⁸⁾}も肺癌のTNM分類に基づく病期と核DNAヒストグラムの関連性を認めている。しかし岩佐¹⁾、花輪¹⁴⁾は癌の進展度や深達度との関連性はほとんど認められないと述べている。本研究では、T分類による進展度が高くなるにつれ、核DNA量が増加、分散が拡大する傾向がみられるが、同一の進展度でも症例によっては核DNA量分布に相違がみられる。これは腫瘍の増殖の速さや、発癌からの時間的要因が関係しているものと思われる。また核DNA量の分散が大きいもの、ヒストグラム多峰型、核DNA量・核面積散布図Ⅳ型ではリンパ節の転移傾向が高かった。これは核DNA量がリ

ンパ節内における癌細胞の増殖能の高さなどに関係して、転移形成能にある程度の役割を果たしているように思われる⁵²⁾。

核 DNA 量と予後との関係については、Atkin³⁷⁾ はさまざまな部位の癌の検索で、子宮頸癌を除き modal C value が highploid(near tetraploid)のものは low ploid(near diploid)のものに比べ予後が不良であるとし、那須⁷⁾、Fu ら⁴⁶⁾も同様の報告を行っている。また Advandilov ら³⁴⁾は子宮、大腸、胃、喉頭癌で 8C 以上の高倍体細胞の出現頻度と予後との、佐々木攻⁴³⁾、佐々木功典⁴⁴⁾は核 DNA の分散と予後との関連性を認めている。しかし部位によっては、これらの相関性が明瞭でないとする報告もある^{37,45)}。口腔扁平上皮癌では、朔¹⁷⁾は核 DNA 量の分散幅の拡大や、異数倍性が予後と関係し、modal C value、平均値、高 C 率などの核 DNA 量の量的な変化とは明らかな関連性はないと報告している。一方、百瀬⁵³⁾は培養細胞の核 DNA 量の検索で modal C value が 3C 域の腫瘍細胞は予後に影響を及ぼすだろうと述べている。本研究では、ヒストグラムパターン 2 峰型、多峰型のものは単峰型に比し、mode III 型は、I、II 型に比し、5 年生存率が明らかに低く、さらに核 DNA 量・核面積散布図 IV 型は 5 年生存率 36% と最も低く、とくに早期死亡例が多い傾向であった。口腔扁平上皮癌の予後には組織学的悪性度や解剖学的部位、宿主反応、治療法などが種々な形で関与していると考えられるが、本研究における核 DNA 量、核面積所見は組織学的悪性度を反映すると同時に、組織像だけでは把握できない細胞回転や cell population など癌細胞の生物学的性状を呈示しているので、癌進展の速さや治療抵抗性など本症の臨床的悪性度の客観的な指標として重要な意義をもつと考えられる。

3. 白板症、疣贅状増殖病変について

白板症は口腔の前癌性病変として古くから注目されているが、最近の WHO の診断基準⁵⁴⁾に従えば、その癌化率はおよそ 3~6%といわれている⁵⁵⁾。一般に上皮異形成のあるものは癌化率が高いと考えられているが^{56~58)}、組織学的に異形成の程度を標準化するの是非常に困難であること⁵⁹⁾、また病変初期に異形成のないものからも癌化が報告されていること^{32,60)}などからすると、本症の悪性化の可能性を予測することは必ずしも容易ではない。一方、悪性腫瘍における核 DNA 量の異常が明らかになるにつれ、この面から、異形成病変、境界病変の悪性化ないし悪性潜在能を評価する試みもなされてきた^{1,8,12,14,18,24,34,36,40,42)}。白板症についてもこれまで北島¹⁶⁾、Grässel ら²¹⁾、Pfitzer ら²⁹⁾、Doyle ら³²⁾、朔⁶⁰⁾、Giménez ら⁶¹⁾の報告がみられる。これらの報告をみると、核 DNA 量の分布は正常粘膜上皮に等しいものから扁平上皮癌に類似するものまで、variation がみられるが個々の症例の前癌性の実際的な評価については、扁平上皮癌との比較が

十分でないことや、組織切片上での判定もみられるなど必ずしも十分とはいえない。

本研究では症例全体をみると核 DNA 量の分布は先人の報告と同様の範囲に位置しており、異形成のあるものは単純な角化症にくらべ核 DNA 量の平均値、分散、4C 以上の細胞頻度、核面積の変動が増加する傾向を示した。しかし、これらの症例においても扁平上皮癌の各指標を大きく逸脱することは少なく、また各指標のすべてが癌の下限値を越えたものは一部に癌を伴った症例 68 のみであった。症例 68 の白板症部において癌化部に近似した核 DNA 量、核面積を示したことはすでにこの時期で癌化にきわめて近い細胞増殖様式を獲得していることを示していると思われる、通常の病理組織学的所見からは把握し難い本病変の悪性潜在能を呈示するものとして興味深い。

また口腔粘膜の乳頭状ないし疣贅状の上皮増殖を主体とするいわゆる疣贅状増殖病変 verrucous hyperplasia はしばしば上皮異形や、ときに癌を合併することがあり、その前癌性が問題にされている³⁾。さらに本病変と乳頭型の癌、あるいは疣贅状癌との鑑別が臨床病理学的に困難な場合も少なくない。本研究でも症例 79 は試験切除の結果、癌と確定し得なかったものであり、症例 80 は一部に初期浸潤癌を伴っていた。核 DNA 所見をみると、本病変全体では正常粘膜上皮や白板症にくらべ核 DNA 量は上昇傾向で 4C 以上の細胞のみられる症例も多く、本病変の細胞増殖活性の亢進を示しているよう。症例 79 では組織学的に上皮細胞の明らかな浸潤増殖が認められないにもかかわらず核 DNA 量の平均値、分散、4C 以上の細胞頻度はいずれも扁平上皮癌の下限域を越え、散布図も癌に類似した所見がみられるなど、本症例は癌と同様の細胞増殖様式を備えているものと考えられる。したがって本症例のような場合には治療は扁平上皮癌に準じた処置が必要となる。また症例 80 では核 DNA 量ヒストグラムの modal C value の peak の低下が顕著で、単なる上皮の増殖性変化とは考えにくく、悪性化の可能性が高い所見といえよう。

V. 結 論

口腔領域の扁平上皮癌 57 例、白板症 13 例、疣贅状増殖病変 10 例、正常口腔粘膜 6 例について核 DNA 量、核面積を測定し、各群の比較検討ならびに、臨床、病理像との関連性を検討し、以下の結果を得た。

1. 末血リンパ球の核 DNA 量を 2.0C とすると、正常粘膜上皮の核 DNA 量の平均値は 1.4~2.0C、その分散は最高 0.12 で、4C 以上の高倍体細胞は認められなかった。核 DNA 量ヒストグラムは 1.5~2.0C に高い modal peak をもつ単峰型を呈した。また核面積も 40 μ^2 前後に限局していた。

2. 扁平上皮癌では核 DNA 量, 核面積は正常域から逸脱し, いずれも高値を示すが症例間にかなり相違がみられた。核 DNA 量ヒストグラムパターンは全体の形から単峰型, 2 峰型, 多峰型に, modal C value から mode I, II, III 型に類別された。また核 DNA 量・核面積の散布図では両者の分散の比較的小さいもの (I 型) から両者の相関性の非常に高いもの (IV 型) まで認められた。

以上の所見は組織学的には異型性と, 臨床的には腫瘍の進展度, リンパ節転移, 予後との関連性が認められた。

3. 白板症および疣贅状増殖病変では単純な過角化の白板症や, 乳頭腫の核 DNA 量と核面積は正常と同じか軽度の変化がみられた。一方, 上皮異形成の認められる例や疣贅状上皮増殖の高度のもの, また一部に癌性変化を伴う例では扁平上皮癌の核 DNA 量, 核面積に近似した。

本論文の要旨は第22回日本口腔外科学会総会 (1977年), 第32回日本口腔科学会総会 (1978年), 第24回日本口腔外科学会総会 (1979年), 第34回日本口腔科学会総会 (1980年), 第26回日本口腔外科学会総会 (1981年), 第36回日本口腔科学会総会 (1982年), 第27回日本口腔外科学会総会 (1982年) において発表した。

引用文献

- 1) 岩佐善二: 固定組織からの細胞分離法を応用した——新核 DNA 量顕微分光測光法ならびにその胃疾患への応用について。阪大医誌 23: 243-264 1971.
- 2) Ackerman, L.V. and McGavan, M.H.: Proliferating benign and malignant epithelial lesions of the oral cavity. J Oral Surg 16: 400-413 1958.
- 3) Shear, M. and Pindborg, J.J.: Verrucous hyperplasia of the oral mucosa. Cancer 46: 1855-1862 1980.
- 4) Leuchtenberger, C., Klein, G., et al.: The estimation of nucleic acids individual isolated nuclei of ascites by ultraviolet microspectrophotometry and its comparison with the chemical analysis. Cancer Res 12: 277-278 1952.
- 5) Leuchtenberger, C., Leuchtenberger, R.: A microspectrophotometric study of the deoxyribose and nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant tissues. Am J Pathol 30: 65-85 1954.
- 6) Atkin, N.B. and Richards, B.M.: Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of feulgen stain: A comparison of tumors arising at different sites.

- Br J Cancer 10: 769-786 1956.
- 7) 那須健治: 肝癌, 肝硬変, 正常肝における核内デオキシリボ核酸量について。阪大医誌 12: 1123-1132 1960.
- 8) Leuchtenberger, C. and Leuchtenberger, R.: Quantitative cytochemical studies on the relation of deoxyribonucleic acid of cells to various pathological conditions. Biochem Pharmacol 4: 128-163 1960.
- 9) 下里常弘: 口腔領域剥離細胞の顕微分光測光について。日口外誌 16: 341-343 1970.
- 10) 下里常弘, 北川純一: 口腔領域剥離細胞の顕微分光学的研究 第1編 正常頬粘膜細胞と腫瘍細胞の比較について。日口外誌 17: 276-280 1971.
- 11) 下里常弘: 顕微分光測光法の口腔外科領域の応用について。口科誌 21: 445-455 1972.
- 12) 中村文武: 子宮頸部各種病変における核 DNA 量定量に関する研究。東医大誌 31: 997-1025 1973.
- 13) Jakobsson, P.A., Killander, P.D., et al.: DNA contents of individual cells from squamous cell carcinoma of the larynx and tongue. Laryngoscope 85: 1701-1706 1975.
- 14) 花輪 聡: 大腸癌の細胞核 DNA 量に関する研究。大腸肛門誌 31: 450-467 1978.
- 15) Caspersson, T.O.: Quantitative tumor cytochemistry. Cancer Res 39: 2341-2348 1978.
- 16) 北島晴比古: 舌病変における細胞核 DNA 量の研究 舌癌を中心として。日口外誌 26: 583-600 1980.
- 17) 朔 敬: 舌扁平上皮癌の予後因子の検討——組織像ならびに核 DNA 量を中心として——。日口外誌 26: 279-294 1980.
- 18) Harada, K., Kimura, T.: Combined DNA and protein cytofluorometry of gynecological smears: Quantitative identification of tumor cells and discrimination of intraepithelial neoplasia from invasive cancer. Acta Histochem Cytochem 14: 24-34 1981.
- 19) 尾崎宏基, 星野一正: 肺癌における DNA モード型の解析とその臨床的意味について。最新医学 36: 1897-1905 1981.
- 20) 藤田哲也: 細胞動態からみた胃癌の発生と進展。日病理会誌 70: 23-54 1981.
- 21) Grässel-Pietrusky, R., Deilein, E., et al.: DNA-ploidy rates in oral leukoplakias determined by flow-cytometry. J Oral Pathol 11: 434-438 1982.
- 22) 小倉良平: DNA と核の代謝 (1)——表皮の核酸——。皮膚科の臨床 19: 767-769 1977.
- 23) Atkin, N.B.: Nuclear size in carcinoma of the cervix: its relation to DNA content and to prognosis. cancer 17: 1391-1399 1964.
- 24) 小山博記: 乳腺症, 乳腺組織の核 DNA 量に関

- する顕微分光測光法による研究. 阪大医誌 17: 105-116 1965.
- 25) Sandritter, W., Carl, M., et al.: Cytophotometric measurement of the DNA content of human malignant tumors by means of the feulgen reaction. *Acta Cytologica* 10: 26-30 1966.
- 26) 三宅清平: 癌の細胞学的研究 第Ⅱ編子宮頸癌の細胞学的研究 (特に染色体と核 DNA 量を中心として). 岡山医会誌 79: 805-820 1967.
- 27) Razzaq, A.K.A.: 顕微分光測光法による大腸の癌および粘膜上皮の増殖病変を中心とする核 DNA 量に関する研究. 阪大医誌 24: 205-220 1972.
- 28) 広瀬俊太, 岩佐善二: DNA 解析——消化管の境界病変の核 DNA 量についての検討. 癌の臨床 18: 859-869 1972.
- 29) Pfitzer, P. and Pape, H.D.: Characterization of tumor cell population by DNA-measurement. *Acta Cytologica* 17: 19-26 1973.
- 30) 下斗米啓介, 西谷 徹: 子宮頸癌細胞における DNA 合成期核の顕微分光学的研究. 日臨細胞会誌 13: 281 1974.
- 31) Böhm, N. and Sandritter, W.: DNA in human tumors: a cytophotometric study. *Current Topics Pathology* 60: 151-219 1975.
- 32) Doyle, J.L. and Manhold, J.H.: Feulgen microspectrophotometry of oral cancer and leukoplakia. *JDR* 54: 1196-1199 1975.
- 33) 佐藤悠二: 顕微分光測光法による子宮頸癌原発巣とその転移巣の核内 DNA 量に関する研究. 慶応医学 53: 367-380 1976.
- 34) Advandilov, G.G.: Perspectives on the use of microspectrophotometry in the diagnosis of pretumorous processes and malignant tumors. *ancer* 38: 254-259 1976.
- 35) 堀口信夫, 荒井 潤, 他: 上頸癌細胞核内 DNA 量の臨床的意義 (抄). 日耳鼻会報 80: 1282 1977.
- 36) Nasiell, M., Kato, M., et al.: Cytomorphological grading and feulgen DNA analysis of metaplastic and neoplastic bronchial cell. *Cancer* 41: 1511-1521 1978.
- 37) Atkin, N.B. and Kay, R.: Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors, based on 1465 cases. *Br J Cancer* 40: 210-221 1979.
- 38) 小中千守: 乳腺腫瘍細胞の核 DNA 定量による診断学的研究. 日臨細胞会誌 18: 127-139 1979.
- 39) 阿部庄作, 大崎 饒, 他: 気管支異型扁平上皮化生細胞の核内 feulgen DNA 量の分析. 癌の臨床 26: 781-786 1980.
- 40) Sandritter, W.: DNA cytophotometry in cellular pathology. 最新医学 35: 777-781 1980.
- 41) 白水健士: 卵巢低悪性度腺腫の腫瘍性格に関する研究. 日産婦誌 32: 427-436 1980.
- 42) 香川恵造: 顕微蛍光 DNA 定量法による liver cell dysplasia および肝癌の解析. 京府医大誌 90: 13-31 1981.
- 43) 佐々木 攻, 亀川隆久, 他: 細胞核 DNA 量分布パターン分析による小粘膜胃癌の悪性度判定に関する研究. 癌の臨床 28: 23-26 1982.
- 44) 佐々木功典, 荻野哲朗, 他: ヒト胃癌細胞核 DNA 量の測定. 日臨細胞会誌 21: 687-692 1982.
- 45) 三谷 一: 卵巢腫瘍細胞核 DNA に関する研究. 東医大誌 40: 99-115 1982.
- 46) Fu, Y.S., Reagan, J.W., et al.: Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix. II. Prognostic value of nuclear DNA analysis. *Cancer* 49: 2571-2577 1982.
- 47) Levi, P.E., Cooper, E.H., et al.: Analysis of DNA content, nuclear size and cell proliferation of transitional cell carcinomas in man. *Cancer* 23: 1074-1085 1969.
- 48) Crissman, H.A., Orlichy, D.J., et al.: Lise of two-parameter (DNA and cell size) flow cytometric analysis for determining the effects of potential chemotherapeutic agents. *Acta Pathol Microbiol scand (A) Flow cytometry IV. supplement N0274*: 526-530 1980.
- 49) Ojima, N., Inui, N., et al.: studies on the DNA content and chromosomes in seven cases of human primary gastric carcinoma. *GANN* 53: 123-128 1962.
- 50) Inui, N. and Oota, K.: DNA content of human tumor cell nucleus; a study on gastric carcinoma with special reference to its histological featur. *GANN* 56: 567-574 1965.
- 51) Wiendl, H.J., Schwabe, M., et al.: Feulgen-cytophotometric studies of gastric mucosal smear sin malignant and benign diseases of the stomach. *Acta Cytol* 18: 222-230 1974.
- 52) 本間義郎: 口腔癌の頸部リンパ節転移に関する研究. 日口外誌 28: 1667-1684 1982.
- 53) 百瀬文雄: ヒト口腔領域における扁平上皮癌由来初代培養細胞の核 DNA 量分布に関する研究. 日口外誌 28: 28-42 1982.
- 54) WHO Collob. Cent.: Oral precancer lesions: definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg* 46: 518-539 1978.
- 55) 石川梧桐: 前癌病変. 日口外誌 27: 1236-1240 1981.
- 56) Mincer, H.H., Coleman, S.A., et al.: Observation of the clinical characteristics of oral lesions showing histologic epithelial dysplasia. *Oral Surg* 33: 389-399 1972.
- 57) Bánóczy, J. and Csiba, A.: Occurrence of

- epithelial in oral leukoplakia. *Oral Surg* 42: 766-774 1976.
- 58) Pindborg, J.J., Daftary, D.K., et al.. A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. *Oral Surg* 43: 383-390 1977.
- 59) Pindborg, J.: *Oral cancer and precancer*. John Wright & Sons, Ltd, Bristol, 1980, p 101.
- 60) 朔 敬, 岡辺治男, 他: 口腔粘膜白板症の癌化過程における核 DNA 量の変動. *歯基礎誌* 24: 182-189 1982.
- 61) Giménez, I.B. and Conti, C.J.: Microspectrophotometric determination of DNA in oral lesions. *J Oral Surg* 35: 465-483 1977.