口腔扁平上皮癌における p 53 癌抑制遺伝子産物の免疫組織化学的検索： PCNA 染色との比較および臨床病理学的関連性について

西岡 博人・上林 豊彦・桐田 忠昭・堀内 敬介
中橋 一裕・堀内 克啓・杉村 正仁・松田 博文*
北堀 吉映*・日浅 義雄*

Immunohistochemical analysis of p 53 tumor suppressor gene product in oral squamous cell carcinoma: comparison with PCNA stain and correlation with clinicopathologic findings

Hiroto NISHIOKA・Toyohiko KAMIBAYASHI・Tadaaki KIRITA
Keisuke HORIUCHI・Kazuhiro NAKAHASHI・Katsuhiro HORIUCHI
Masahito SUGIMURA・Hirofumi MATSUDA*・Yoshiteru KITAHORI*
Yoshio HIASA*

Abstract: The present paper reports the expression of tumor suppressor gene product p 53 in biopsy specimens obtained from 40 cases of oral squamous cell carcinoma, studied by optimal immunohistochemical technique. The results are compared with those derived by immunohistochemical detection of PCNA (PC 10) and their relation ship with clinicopathologic findings is also described.

Immunohistochemical expression with monoclonal antibodies (BP 53-12) to p 53 showed positive staining in 21 cases (52%).

In these cases, evidence of p 53 was significantly correlated with positive reaction to PCNA ($P < 0.01$).

Moreover, the expression of p 53 was positively correlated with histopathological signs of malignancy such as the mode of invasion and degree of histological differentiation.

Key words: p 53 (p 53), oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌), PCNA (PCNA), clinicopathologic findings (臨床病理学的所見)

緒 言

p 53癌抑制遺伝子変異は、消化器癌¹⁾をはじめとし卵

巣癌²⁾、乳癌³⁾など多くの癌細胞で比較的高頻度に検出され癌化に重要な遺伝子変異と考えられている。また、p 53蛋白は変異遺伝子により発現した変異蛋白であることもあきらかとなっている⁴⁾。

一方、PCNA (proliferating cell nuclear antigen) は細胞周期の G₁ から S 期にかけて合成される核蛋白で、細胞増殖能の指標として用いられている⁵⁾。

今回、筆者らは p 53 のモノクローナル抗体である BP 53-12^{6,7)} を用い、口腔領域に発生する悪性腫瘍の大部分を占める扁平上皮癌の生検材料を対象として、p 53 の発現を免疫組織化学的ならびに臨床病理学的に検索を行った。さらに、p 53 陽性と PCNA による免疫組織化学染色の結果を合わせて検討も行ったのでここに報告する。

奈良県立医科大学口腔外科学教室
(主任：杉村正仁教授)

* 奈良県立医科大学第二病理学教室
(主任：日浅義雄教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Nara Medical University (Chief: Prof. Masahito Sugimura)

* Department of 2nd Pathology, Nara Medical
University (Chief: Prof. Yoshio Hiasa)

受付日：平成 4 年 9 月 17 日

対 象

1989年5月 日 から1992年6月 日までの間に、
口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌新鮮例を対象とした。試料は40例（男性25例・女性15例）で、平均年齢は男性63歳（45歳～86歳）、女性67歳（23歳～86歳）であった。なお、対照としては正常ならびに異型粘膜上皮を各3試料ずつ用いた。

方 法

1. パラフィン包埋の口腔扁平上皮癌組織を用いた P 53ならびに PCNA の最適検出条件の検討

1) P 53を確実に短時間で検出できる条件を設定するために、大腸癌、卵巣癌および口腔扁平上皮癌を材料として以下の点について検討した。①一次抗体の反応条件、②二次抗体およびストレプトアビジン・ペルオキシダーゼの反応条件。

① 一次抗体の反応条件

抗体はモノクローナル抗体抗 P 53蛋白（BP 53-12）、日本ターナー社）を用い、濃度（100倍希釈、200倍希釈、400倍希釈）、反応時間（1時間、2時間、overnight）、反応温度（37℃、室温、4℃）について比較検討した。

② 二次抗体（ビオチン化抗マウス IgG 抗体）およびストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ（Maxi Tags: Lipshaw, USA）の反応条件

二次抗体（原液、2倍希釈）とストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ（15倍希釈、30倍希釈）は反応時間を一定に濃度を変えて比較検討した。なお、反応温度はすべて室温であった。

2) PCNA の免疫組織化学染色の条件設定では、抗 PCNA モノクローナル抗体（IgG 2a, PC 10 Novocastra 社）の希釈濃度を100倍希釈、200倍希釈、400倍希釈と変化させて室温下にて60分あるいは90分間反応させた。

2. パラフィン包埋の口腔扁平上皮癌組織を用いた P 53および PCNA の検索

P 53検出方法は、2～3 μm に薄切したパラフィン切片をキシロールとエタノールで脱パラフィン後 Tris HCl buffer (pH 7.6) で洗浄し、0.5% H₂O₂ 含有メタノールで内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。非特異的反応の除去は2倍希釈した正常ロバ血清にて行った。一次抗体の反応は、前段階の実験で得られた100倍希釈、37℃、1時間とした。ビオチン化二次抗体は2倍希釈で、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼは15倍希釈で、室温、30分間おのおの反応させた。発色はdiaminobenzidine (DAB) を用い、核染色はマイヤーのヘマトキシリンで行った。精度管理のため、毎回陽性コ

表 1 一次抗体の条件

一次抗体	希釈倍数	温度	時間	反応程度
p 53 (BP 53-12)	100倍	4℃	一日夜	—
	100倍	室温	120分間	±
	100倍	37℃	60分間	+
	200倍	37℃	60分間	±
	400倍	37℃	60分間	—
PCNA (PC 10)	100倍	室温	60分間	+
	100倍	室温	90分間	±
	200倍	室温	90分間	±
	400倍	室温	90分間	—

ントロールと陰性コントロールスライドを設けた。

PCNA 検出方法は、脱パラフィン、内因性ペルオキシダーゼの除去後、ブロッキング血清としてウマ血清を室温、30分間用いた後、抗 PCNA 抗体を100倍希釈で室温、90分間反応させた。Tris HCl buffer (pH 7.6) で洗浄後、ビオチン化抗マウス IgG 抗体および ABC complex (Vectastain ABC Kit: Vector 社) をおのおの30分間、いずれも室温で反応させた。ペルオキシダーゼ発色には DAB を用い、ヘマトキシリンで核染色を行った。

P 53と PCNA の評価方法としては、病変内の約200個の細胞核を観察しそれぞれの labeling index (LI) を求めた。染色強度は、正常または異型粘膜上皮を参考にして以下のごとく分類した。P 53 は LI が39%以下を+、40%以上を±、褐色に染色された核質を認めないものを陰性(—)と判定した。PCNA は LI が39%以下を+、40%以上を±と判定した。

結 果

1. パラフィン包埋の口腔扁平上皮癌組織を用いた P 53蛋白ならびに PCNA の最適検出条件

① 一次抗体の反応条件の検討

BP 53-12 抗体をより低濃度で用いるために希釈濃度、反応温度および反応時間について検索したが、100倍希釈濃度で 37℃、1時間において最も良好な感度を得た(表1)。

② 二次抗体およびストレプトアビジン・ペルオキシダーゼの反応条件の検討

二次抗体は2倍希釈で室温、30分間の反応条件が、原液で室温、30分間の反応条件と同じ結果を得ることができた。それ以上の希釈濃度では、感度の低下がみられた。ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼは、15倍希釈濃度までは良好な結果を得るが、それ以上の希釈濃度になると感度の低下を示した。反応温度ならびに反応時

写真 1 扁平上皮癌症例の免疫組織化学染色による p53陽性像 (×200)

写真 2 扁平上皮癌症例の免疫組織化学染色による PCNA 陽性像 (×200)

間は室温、30分間であった。

2) 抗 PCNA モノクローナル抗体は、100 倍希釈濃度、室温、90分間の反応条件において最適であった (表 1)。

2. パラフィン包埋の口腔扁平上皮癌組織を用いた p53および PCNA の免疫組織化学的検索

1) p53 および PCNA 陽性細胞の局在

p53陽性は癌細胞核内に褐色調としてみられ (写真 1)、多くは癌細胞巣周辺部に認められ、間質内に散在性に浸潤する場合にも認めることができた。PCNA陽性細胞は細胞核に陽性で癌細胞巣中央部にもみられるが、圧倒的にその周辺部において多く認められた (写真 2)。また、癌細胞が間質に散在性に浸潤しているところでは、そのほとんどが PCNA 陽性を示した。

2) p53陽性率と PCNA 陽性率との比較検討

正常口腔粘膜上皮はすべて p53陰性であったが、異型上皮では p53陽性がその一部に認められ、その発現は基底細胞および傍基底細胞にみられた。扁平上皮癌組織に

表 2 p 53 陽性率と PCNA 陽性率

	PCNA		
	(+)	(++)	計 (%)
(-)	11 (57)	8 (42)	19 (47)
p 53 (+)	1 (8)	11 (91)*	12 (30)
(++)	1 (11)	8 (88)*	9 (22)

p 53(-)：陰性，(+)：39%以下陽性，(++)：40%以上陽性

PCNA(+): 39%以下陽性，(++)：40%以上陽性

* P<0.01

表 3 分化度と p53陽性頻度

分化度	症例数	頻度 (%)	染色強度		
			(-)	(+)	(++)
高分化型	36	19 (52)	17	10	9
中分化型	1	0 —	1	—	—
低分化型	3	2 (66)	1	2	0

p 53(-)：陰性，(+)：39%以下陽性，(++)：40%以上陽性

おいては、p 53 陽性は52% (21/40) に認められた。PCNA 陽性は++以上が67% (27/40) にみられた。染色強度では、p 53 が+で PCNA が++と判定された症例は91% (11/12)，p 53 が+で PCNA が++と判定された症例は88% (8/9) に認められた (表 2)。

3) 組織分化度と p53陽性頻度との関係

分化度は、頭頸部癌取り扱い規約の基準⁹⁾によって、高分化型、中分化型および低分化型の 3 型に分類した。

全症例40例中高分化型は36例、中分化型は 1 例、低分化型は 3 例で、ほとんどが高分化型であった。p 53陽性頻度は高分化型が52% (19/36)、低分化型は66% (2/3) であった (表 3)。

4) 浸潤様式と p53陽性頻度との関係

浸潤様式は、Willen ら⁹⁾ の tumor-host relationship における mode of invasion の分類に従って 4 型に分類した。

1 型は 0 例、2 型は 4 例、3 型は21例、4 型は15例で 3 型と 4 型が多くみられた。p 53 陽性率は 2 型が 50% (2/4)、3 型が42% (9/21)、4 型が66% (10/15) であった (表 4)。

5) 臨床視診型と p53陽性頻度との関係

初診時原発巣は、藤崎ら¹⁰⁾の分類に従って、その肉眼的特徴によって浸潤びらん型、腫瘤型、肉芽型、白斑型、乳頭腫型の 5 型に分類した。

その結果は、潰瘍びらん型21例、腫瘤型 3 例、肉芽型 13例、白斑型 3 例、乳頭腫型 0 例であった。潰瘍びらん

表 4 浸潤様式と P53陽性頻度

	症例数	頻度(%)	染色強度		
			(-)	(+)	(++)
1 型	0	—	—	—	—
2 型	4	2 (50)	2	1	1
3 型	21	9 (42)	12	7	2
4 型	15	10 (66)	5	4	6

p53(-): 陰性, (+): 39%以下陽性, (++) : 40%以上陽性

表 5 臨床視診型と P53陽性頻度

	症例数	頻度(%)	染色強度		
			(-)	(+)	(++)
内向型					
潰瘍びらん型	21	9 (42)	12	6	3
腫瘤型	3	2 (66)	1	—	2
外向型					
肉芽型	13	8 (61)	5	5	3
白斑型	3	2 (66)	1	1	1
乳頭腫型	—	—	—	—	—

p53(-): 陰性, (+): 39%以下陽性, (++) : 40%以上陽性

表 6 原発部位と P53陽性頻度

	症例数	頻度(%)	染色強度		
			(-)	(+)	(++)
舌	16	13 (81)	3	7	6
歯肉	13	3 (23)	10	2	1
口底	6	4 (66)	2	2	2
頬	4	1 (25)	3	1	—
口唇	1	0 —	1	—	—

p53(-): 陰性, (+): 39%以下陽性, (++) : 40%以上陽性

型が最も多く、次いで肉芽型が多くみられた。P53陽性率は、各臨床視診型にはほぼ同じ割合で認められた(表5)。

6) 原発部位と P53陽性頻度との関係

今回用いられた症例の原発部位は、舌が16例、歯肉が13例、口底が6例、頬粘膜が4例、口唇が1例であった。原発部位は舌、歯肉が多く、次いで口底の順であったが、P53の陽性頻度は舌が81%、口底が67%、歯肉が23%を示した(表6)。

7) TNM ならびに Stage 分類と P53 陽性頻度との比較検討

TNM 分類¹¹⁾によるT分類では T1 が5例、T2 が18例、T3が8例、T4 が9例、またN分類では N0 が16例、N1 が14例、N2 が10例、N3 が0例、M 分類では全例 M0 であった。Stage 分類は、Stage I が5例、II が9例、III が11例、IV が15例であった。P53の陽性頻度は、T1 が100%、T2 が39%、T3 が75%、T4 が33%であった。各 Stage におけるP53陽性頻度では、Stage I が100%、II が44%、III が45%、IV が46%を示した。

考 察

P53遺伝子は細胞を不死化させ、ras 遺伝子と共同してラットの初代培養胎児線維芽細胞を悪性形質転換するため当初癌遺伝子と考えられていた¹²⁾。しかし、Friend マウス白血病ウイルスの研究により、P53遺伝子変化に起因するP53蛋白発現の低下と白血病発症の関連性が示唆され¹³⁾、ヒト骨肉腫においてもP53遺伝子の変化とP53蛋白の発現低下が見出された¹⁴⁾。これらの報告^{13,14)}からP53蛋白が癌抑制遺伝子産物であることが判明した。つまり、トランスフォーム能を有するのは変異型P53であり野生型P53は癌抑制遺伝子の1つであることがあきらかとなっている¹⁵⁾。また、野生型P53蛋白に較べて、変異P53蛋白の核内での半減期は数時間にも及ぶことも報告されている¹⁶⁾。今回、筆者らは未治療の口腔扁平上皮癌における変異P53蛋白の発現を、一次抗体ならびに二次抗体などの検索によって確立した免疫組織化学染色法を用いて検討した(表1)。使用した抗P53モノクローナル抗体(BP53-12)は野生型から得られた抗体で、N末端に近いアミノ酸を認識しているため安定した構造を有している。さらに、従来の抗体と違いホルマリン固定でパラフィン包埋された組織に用いることが可能である⁶⁾。

今回の実験結果では、口腔扁平上皮癌のP53陽性頻度は52%であった。他臓器部位でのP53検出に関しては、Bennett ら¹⁷⁾が43例の食道癌を対象とした免疫組織化学的検索を行った結果、55%の陽性頻度を認め、そのうち35例の扁平上皮癌においては51%が陽性であったことを報告している。また、遺伝子変化についての検索では、Tamura ら¹⁸⁾がPCR-SSCP 分析を用いて26例の食道癌中38%に遺伝子変化を認め、Mitsudomi ら¹⁹⁾は同様の検索方法から肺扁平上皮癌8例中6例に遺伝子変化があったことを報告している。Sakai ら²⁰⁾は口腔扁平上皮癌培養細胞15例中14例において、Exon 5-8 にP53の遺伝子変化を認めている。野生型P53遺伝子の役割は細胞増殖に対する調節機能であるが¹⁵⁾、変異型P53はDNA構造に変異を受けているために、内在するP53に対して dominant negative effect を示す。一方、PCNA は cyclin

表 7 TNM 分類と P 53陽性頻度

	T1	T2	T3	T4	計 (%)
N0	○○○○◎	●●●●●○○◎	○○	●	10/16 (62)
N1		●●●●●○○	●○	●●●●○	4/14 (28)
N2		●○○	●○○◎	●○○	7/10 (70)
N3					—
計 (%)	5/5 (100)	7/18 (38)	6/8 (75)	3/9 (33)	21/40 (52)

●：P 53陰性，○：39%以下陽性，◎：40%以上陽性

とも呼ばれる非ヒストン核蛋白質（分子量36 kD，等電点4.8）に属し，DNA polymerase- δ の補助蛋白質である^{19）}．PCNA は G₁ 後期に核小体を中心に出現し，S 期には核質全体におよび，S 期後期を過ぎると消失していくとされている^{21）}．抗 PCNA モノクローナル抗体の特異性は，抗 BrdU モノクローナル抗体やフローサイトメトリーとの相関性においても確認されている^{22）}．なお，今回使用した PC 10 は，大腸菌から得られた融合蛋白質を抗原として作成されたものである．以上の知見をもとに P 53陽性症例の PCNA 陽性率を検討した結果，P 53陽性症例（52%）のほとんどが PCNA 強陽性であった．この結果は，変異 P 53蛋白が口腔扁平上皮癌細胞の cell cycle を上昇させてより悪性化を促している可能性を示唆するものである．現に，当科では，生検時 severe dysplasia と病理組織診断された症例が P 53 と PCNA の高陽性率を示し，切除材料において高分化型扁平上皮癌と診断された症例を経験している（表 2）．

組織悪性度が組織分化度と関係することは口腔癌に限ったことではないが，低分化型の P 53陽性頻度は高分化型よりやや高く，組織分化度と変異 P 53蛋白の出現が逆相関していることが考えられる（表 3）．さらに，P 53陽性症例を Willen ら^{9）}の分類を用いて検討した結果，最も浸潤傾向の強い 4 型においてやや高い発現頻度（66%，10/15）を認めた（表 4）．以上の検索から，変異 P 53蛋白の出現と組織学的悪性度の関係が示唆される．しかしながら，高分化型においても 52%の出現頻度を示すことや低分化型の症例数が少ないこと，そして，摘出標本においても同様な結果が得られるのか，といった問題点もあるためさらなる検索が必要である．

臨床的に口腔扁平上皮癌は，内向型あるいは外向型増殖を示す形をとる．藤崎ら^{10）}は，48例の口腔扁平上皮癌を臨床視診型として，2つの内向型と3つの外向型に分類している．今回の研究成果をこの分類に従って検討してみたが，特記すべき結果は得られなかった（表 5）．一方，口腔扁平上皮癌の原発部位が舌や歯肉に多いことは周知の事実であるが^{23）}，原発部位における biological behavior については不明な点が多い．著者らは，P 53

表 8 Stage 分類と P 53陽性頻度

Stage	症例数	P 53陽性頻度 (%)	染色強度		
			(-)	(+)	(++)
I	5	5(100)	—	3	2
II	9	4 (44)	5	2	2
III	11	5 (45)	6	3	2
IV	15	7 (46)	8	4	3

P 53(-)：陰性，(+)：39%以下陽性，(++)：40%以上陽性

陽性が舌（81%，13/16）に高頻度で，歯肉に低頻度（23%，3/13）である結果を十分に説明することはできない（表 6）．けれども，T1 陽性例の全例ならびに T3 陽性例のわずか 2 例が舌原発であることを考え合わせると，癌発生部位よりむしろ癌細胞増殖過程への変異 P 53蛋白の関係が示唆される（表 7）．それは，Stage 分類と P 53陽性頻度においても，癌増殖の比較的早期において発現しているように考えられる（表 8）．

著者らの研究結果から，変異 P 53蛋白は口腔扁平上皮癌の組織学的悪性度と関連性を有すると考えられる．今後，変異 P 53蛋白の発現が癌治療，予後そして転機にどのような影響を及ぼすかについてさらに検索が必要と思われる．

結 語

口腔扁平上皮癌40例の生検組織を対象に免疫組織化学的染色法を用いて，P 53の発現を PCNA 染色との結果も合わせて臨床病理学的に検索したところ，以下の結果が得られた．

- 1）口腔扁平上皮癌の52%に P 53陽性を認め，その局在は癌細胞巣周辺部に多く認められた．
- 2）P 53陽性と PCNA 陽性には相関性が認められ（ $P<0.01$ ），P 53陽性は癌細胞の cell cycle が促進していることが認められた．

3) P53陽性は低分化型で66%, 4型の浸潤様式を示す症例においては66%の頻度を示し, 病理組織学的悪性度との関係が示唆された。

4) P53陽性は舌癌に81%と高頻度で, 歯肉癌は23%と低頻度であった。

5) P53陽性は, TNM分類のT1N0M0とStage分類のIにおいて100%と高頻度に認められ, 癌増殖の早期レベルでの関連性が考えられた。

引用文献

- 1) Miyaki, M., Seki, M., et al.: Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 50: 7166-7173 1990.
- 2) Mazars, R., Pujol, P., et al.: p 53 mutations in ovarian cancer: a late event? *Oncogene* 6: 1685-1690 1991.
- 3) Osborne, R. J., Merlo, G. R., et al.: Mutations in the p 53 gene in primary human breast cancers. *Cancer Res* 51: 6194-6198 1991.
- 4) Finlay, C. A., Hinds, P. W., et al.: The p 53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093 1989.
- 5) 守内哲也, 和泉伸一: PCNA (DNA ポリメラーゼδ補助蛋白質). *細胞* 21: 99-103 1989.
- 6) Bartek, J., Bartkova, J., et al.: Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6: 1699-1703 1991.
- 7) 新谷 悟, 松村智弘, 他: 口腔領域悪性腫瘍における癌抑制遺伝子産物P53の免疫組織化学的検索. *日口外誌* 38: 1274-1279, 1992.
- 8) 日本頭頸部腫瘍学会編: 臨床・病理頭頸部癌取扱い規約. 第二版, 金原出版, 東京, 1991, 19-24頁.
- 9) Willen, R., Nathanson, A., et al.: Squamous cell carcinoma of the gingiva. *Acta Otolaryngol* 79: 146-154 1975.
- 10) 藤崎 誠: 口腔扁平上皮癌における病理組織学的所見と予後に関する臨床的研究. *日口外誌* 36: 343-357 1990.
- 11) UICC: TNM classification of malignant tumours. Fourth fully revised edition. International Union Against Cancer, Geneva, 1987, p 13-29.
- 12) Eliyahu, D., Raz, A., et al.: Participation of p 53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312: 646-649 1984.
- 13) Ben-David, Y. and Bernstein, A.: Friend virns-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. *Cell* 66: 831-834 1991.
- 14) Chen, P.-L., Chen, Y., et al.: Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p 53 gene. *Science* 250: 1576-1580 1990.
- 15) Baker, S. J., Markowitz, S., et al.: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p 53. *Science* 249: 912-915 1990.
- 16) Oren, M., Maltzman, W., et al.: Post-translational regulation of the 54 K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 1: 101-110 1981.
- 17) Bennett, W. P., Hollstein, M. C., et al.: Archival analysis of p 53 genetic and protein alterations in Chinese esophageal cancer. *Oncogene* 6: 1779-1784 1991.
- 18) Tamura, G., Maesawa, C. et al.: p 53 gene mutations in esophageal cancer detected by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 83: 559-562 1992.
- 19) Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., et al.: p 53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* 7: 171-180 1992.
- 20) Sakai, E. and Tsuchida, N.: Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p 53 tumor-suppressor genes. *Oncogene* 7: 927-933 1992.
- 21) 田中一成: 抗 PCNA 抗体による増殖細胞核の染色ーパラフィン切片への応用ー. *病理と臨床* 9: 791-798 1991.
- 22) Garcia, R. L., Coltrera, M. D., et al.: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol* 134: 733-739 1989.
- 23) 美馬孝至, 浦出雅裕, 他: 当科における過去9年間(1978年~1986年)の悪性腫瘍の臨床統計的観察ー特に口腔および上顎扁平上皮癌症例についてー. *日口外誌* 34: 349-356 1988.