細胞増殖動態とアポトーシス誘導率を指標とした 口腔癌の術前化学療法効果の判定

辻 司***・野口 誠**・金城尚典**
木戸幸恵**・久保田裕美**
竹村佳奈子**・小浜源郁**

Evaluation of effects of preoperative chemotherapy based on cell proliferation kinetics and apoptotic index in oral squamous cell carcinoma

TSUJI Tsukasa***・NOGUCHI Makoto**・KINJYO Hisanori**
KIDO Yukie**・KUBOTA Hiromi**・TAKEMURA Kanako**
KOHAMA Gen-iku**

Abstract: In this retrospective study, the relations between changes in cell proliferation kinetics and induced apoptosis in oral squamous cell carcinoma were examined before and after preoperative chemotherapy to clarify significance of such changes. In an additional study, multivariate analysis was performed to attempt to predict changes in cell proliferation kinetics.

Apoptotic index (AI) increased in all cases, although there were some differences in degree. With respect to the change in cell proliferation kinetics, left-shift-type and right-shift-type AI was clearly high before chemotherapy and increased significantly after chemotherapy as compared with the non-effective type of AI.

The 5-year cumulative survival rate was 91% in patients with less than 10% of the exceeding 4c rate of nuclear DNA content (4cER) and 62% in patients with 10% or higher 4cER. In patients with low 4cER, survival rates were excellent regardless the change in cell proliferation. On the other hand, survival rate was significantly worse in the non-effective type, while survival rates were relatively good in the left-shift type and the right-shift type: 76% for the left-shift type, 74% for the right-shift type, and 35% for the non-effective type. Thus, we attempted to predict the non-effective type. Clinical stage (UICC), G-category (UICC), mitotic index, 4cER, and AI were entered into logistic regression analysis as covariates. AI and 4cER were selected as independent variables for the prediction of non-effective type.

In conclusion, left-shift-type and the right-shift-type changes in cell proliferation kinetics seemed to be favorable in terms of induced apoptosis, and had excellent survival rates. AI and 4cER were the most powerful predictors of the change in cell proliferation kinetics.

Key words: cell proliferation kinetics (細胞増殖動態), apoptosis (アポトーシス), nuclear DNA content (核DNA量), preoperative chemotherapy (術前化学療法), oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌)

*函館中央病院歯科口腔外科
(主任: 喜田正孝科長)

**札幌医科大学医学部口腔外科学講座
(主任: 小浜源郁教授)

*Department of Dentistry and Oral Surgery,
Hakodate Central General Hospital (Chief: Dr.

KIDA Masataka)

**Department of Oral Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine (Chief: Prof. KOHAMA Gen-iku)

受付日: 2002年8月2日

採択日: 2002年12月17日

緒 言

固形癌に対する術前化学療法は、増殖相にある腫瘍細胞の増殖活性を制御し、腫瘍容積を縮小させることにより根治療法の効果を高め、治療成績の改善を図ることを目的として行われてきた¹⁾。頭頸部癌の治療においては、癌の根治性ばかりではなく、口腔の機能温存または失われた機能の回復が重要な課題の1つであることはいうまでもない。個々の腫瘍特性を反映した術前療法効果の判定により機能温存療法また縮小手術が行われることが期待される。しかし癌の細胞特性からみた術前化学療法効果の評価と治療成績に関する研究は乏しく十分な成果が得られていないのが現状である。

近年、細胞集団の増殖動態の観察から、化学療法効果を客観的に検討することが試みられ、効果判定の精度向上のみならず根治手術の予後あるいは後療法の選択に際し、重要な情報が提供されることが明らかになってきた^{2~6)}。著者らは口腔扁平上皮癌に対する術前化学療法効果を細胞核DNA量と核分裂指数に基づく増殖動態の推移から検討し、それらが予後も反映する効果判定になり得ることを報告した^{7~9)}。一方、化学療法または放射線療法によって、癌細胞のアポトーシスが誘導されることが、*in vitro*ならびに臨床材料から確かめられており、治療上有利な現象と考えられている^{10~17)}。

本研究では、術前化学療法による口腔扁平上皮癌の増殖動態の推移とアポトーシス誘導の関係を明らかにすることで増殖動態の意義を追及しさらにその術前予測を試みた。

対 象 症 例

対象症例は、術前化学療法後に根治手術を行い2年以上経過観察をした口腔扁平上皮癌一次症例、87例とした。原発部位の内訳は舌：53例、口底：22例、歯肉：8例（上顎1，下顎7），頬粘膜：4例である。臨床病期（UICC, 2002年）はⅠ期：12例、Ⅱ期：28例、Ⅲ期：25例、ⅣA期22例で、組織所見のgradeによるG分類（UICC, 2002年）ではG1：40例、G2：38例、G3：9例であった。術前化学療法はCDDP（80-160mg）とBLM（45-60mg）の多剤併用療法である。根治手術は術前化学療法後、1週間を目処に行なった。なお術前に動注化学療法、放射線療法を併用した症例は除外した。

方 法

1. 核 DNA 量の測定法

生検組織および切除標本をホルマリン固定・パラフィン

包埋した後、厚さ5 μ mの連続切片を作成し通常のHematoxylin-Eosin（H-E）染色ならびにFeulgen染色を施した。H-E染色標本を参考にして、生検組織ならびに手術切除組織の癌発育先進部における核DNA量を画像解析装置SAMBA 4000 cell image analysis system（IPI社製）を用いて一切片あたり200-230個の癌細胞を測定した。各切片ごとに20個のリンパ球を選択、測定し、その平均値を理論的二倍体値（2C）とし内部標準とした。これらの変動係数（coefficient of variation: CV値）は最小3.6%～最大10.8%で、平均値は7.6 $\pm$ 1.6%であった。

以上に基づいて測定した癌細胞の核DNA量から、各症例のDNAヒストグラムを作成した。さらにヒストグラム上の4cを越える細胞の割合（超4c率）を指標とした場合、超4c率が10%以上の症例の治療成績が不良であることを示した仲盛ら¹⁸⁾の報告に基づき、対象症例を超4c率10%未満群と10%以上群に分けて検討を行った。

2. 核 DNA 量の評価法

各症例のDNAヒストグラムから、術前化学療法前後の平均核DNA量を算出した。なお術前化学療法後の切除組織に癌細胞を認めなかった症例では平均核DNA量は便宜的に0とした。術前化学療法前後の変化については、同一標本上の発育先進部で異なる任意の視野を3ないし5か所を観察した場合の平均DNA量のCV値が最小1.8から最大4.8%にわたっていた。そこで化学療法前後で、5%以上の増減を示した症例を変化あり（増加または減少）とし、それ未満のものについては便宜的に変化なしとした。

3. 核分裂指数（Mitotic Index 以下, MI）の算定

核DNA量を測定した部位に相当する部位の癌細胞1000個当たりの核分裂像を示す分裂細胞の数を算定し、比率（%）を求めた。なお術前化学療法後の切除組織に癌細胞を認めなかった症例ではMIの値は便宜的に0とした。術前化学療法前後の変化については、同一標本上の発育先進部で異なる任意の視野を3ないし5か所を観察した場合のMIのCV値が最小10.1%から最大17%にわたっていたので、術前化学療法前後で20%以上の増減を示した症例を有意な変化とした。

4. アポトーシス細胞標識率（Apoptotic Index 以下 AI）の算定

Gavrieliら¹⁹⁾によるTUNEL染色を通法に従い行なった。本染色切片とH-E染色切片によりアポトーシス細胞の観察を試みた。測定対象細胞は、核DNAを測定した部位を含めた2000個以上とし、これに含まれるアポトーシス細胞の比率（%）として算出した。術前化学療法前後の変化

表1 超4c率10%未満群と10%以上群の臨床病理学的所見

臨床病理学的所見		超4c率	
		10%未満群 (n=39)	10%以上群 (n=48)
原発部位	舌	19	34
	口底	14	8
	歯肉	5	3
	頬粘膜	1	3
T分類*	T1	8	7
	T2	19	24
	T3	6	9
	T4	6	8
臨床病期*	I	6	6
	II	15	13
	III	10	15
	IVA	8	14
G分類*	G1	21	19
	G2	16	22
	G3	2	7

*UICC, 2002

については、MIの算定法と同様に観察を行った。

結 果

5. 術前化学療法前後の癌の増殖動態の推移

平均核DNA量、MIの変化値よりNoguchiら⁹⁾の報告に準じて以下のごとく分類した。

(1) 左方移動型：平均核DNA量とMIがともに減少しDNAヒストグラムが左方移動したもの。

(2) 右方移動型：平均核DNA量は増加しDNAヒストグラムが右方移動したが、MIが減少したもの。

(3) 無効型：(1)(2)の変化が乏しく、MIが不変または増加したもの。

6. 統計処理

術前化学療法前後の平均核DNA量、MIおよびAIの平均値の差の検定はWilcoxonの符号順位検定を行った。但し術前化学療法後の切除組織に癌細胞を認めなかった症例(7例)のAIはこの検定から除外した。治療成績の評価はKaplan-Meier法による5年累積生存率(cause specific survival rate)を求め、Log-rank testにより有意差検定を行った。検定結果は $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。また種々の臨床所見より無効型の予測因子を選択するために多変量logistic回帰分析を行った。計算には、統計プログラムパッケージSPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)を用いた。

1. 生検組織における超4c率

対象87例における超4c率は、1.4%から42.6%にわたり、その平均値は $12.8 \pm 8.5\%$ であった。超4c率10%未満群と10%以上群に大別するとそれぞれ39例、48例であった。原発部位、T分類、臨床病期ならびにG分類の内訳を示した(表1)。

2. 術前化学療法前後の平均核DNA量、MIに基づく増殖動態の推移と治療成績

超4c率10%未満群における左方移動型は23/39例で、右方移動型は16/39例であった(表2)。超4c率10%以上群における左方移動型は19/48例、右方移動型は13/48例、無効型は16/48例であった(表2)。

超4c率10%未満群における5年累積生存率は、91.0%で左方移動型は88.2%右方移動型は93.8%であった。また超4c率10%以上群における5年累積生存率は62.1%で左方移動型は76.4%、右方移動型74.0%、無効型は35.4%であった(表3)。

3. アポトーシス細胞の発現誘導

1) 形態学的観察

アポトーシスの発現様相は、高、中分化癌の胞巣内の癌真珠のみに認められる群と低分化傾向の癌胞巣内にびまん性

表2 術前化学療法前後の平均核 DNA 量と MI に基づく増殖動態の推移

超 4c 率	増殖動態の推移*	平均核 DNA 量		p 値	MI (%)		P 値
		化療前	化療後		化療前	化療後	
10%未満群 (n=39)	左方移動型 (n=23)	2.50±0.19	1.64±0.91	0.0002	0.68±0.29	0.20±0.26	<0.0001
	右方移動型 (n=16)	2.47±0.13	3.18±0.39	<0.0001	0.93±0.41	0.37±0.24	<0.0001
10%以上群 (n=48)	左方移動型 (n=19)	3.12±0.44	2.23±0.90	<0.0001	1.09±0.45	0.58±0.38	<0.0001
	右方移動型 (n=13)	2.89±0.18	3.34±0.30	<0.0006	0.98±0.38	0.50±0.28	0.0006
	無効型 (n=16)	3.06±0.38	3.19±0.4	0.0222	0.98±0.42	0.96±0.33	N.S

増殖動態の推移*

左方移動型；平均核 DNA 量と MI がともに減少し、DNA ヒストグラムが左方移動したもの。

右方移動型；平均核 DNA 量は増加し DNA ヒストグラムが右方移動したが、MI が減少したもの。

無効型；上記の型の変化が乏しいか、MI が不変または増加したもの。

表3 増殖動態の推移と臨床病期ならびに 5 年累積生存率

超 4c 率	増殖動態の推移	臨床病期				5 年累積生存率 (%)	p 値
		I	II	III	IV A		
10%未満群 (n=39)	左方移動型 (n=23)	4	10	6	3	88.2	N.S
	右方移動型 (n=16)	2	5	4	5	93.8	
10%以上群 (n=48)	左方移動型 (n=19)	1	3	8	7	76.4	0.035
	右方移動型 (n=13)	2	6	3	2	74.0	
	無効型 (n=16)	3	4	4	5	35.4	

表4 増殖動態の推移からみた術前化学療法前後の AI

超 4c 率	増殖動態の推移	AI (%)		p 値
		化療前	化療後	
10%未満群 (n=34)	左方移動型 (n=18)	2.56±1.67	3.56±1.92	p<0.01
	右方移動型 (n=16)	1.85±0.86	2.79±1.09	p<0.01
10%以上群 (n=46)	左方移動型 (n=17)	2.03±1.12	3.05±1.48	p<0.01
	右方移動型 (n=13)	2.49±1.94	3.49±2.03	p<0.01
	無効型 (n=16)	1.12±1.11	1.50±1.38	p<0.01

に発現する群さらに癌真珠内部、癌胞巣内ともにアポトーシス細胞が散在して発現するおおむね 3 群が認められた。

2) 増殖動態に基づく AI の推移

超 4c 率 10% 未満群における AI は 0.5~7.9% に分布し、平均 2.17±1.38% であった。左方移動型の化学療法前の AI は 2.56±1.67 で、化学療法後は 3.56±1.92% であった (p<0.01)。右方移動型の AI の化学療法前後の変化はおの 1.85±0.86%, 2.79±1.09% であった (p<0.01) (表 4)。

超 4c 率 10% 以上群における AI は 0.2~7.2% に分布し、平均 1.84±1.48% であった。同群の左方移動型の化学療法

前の AI は、2.03±1.12%, 化学療法後は 3.05±1.48% であった (p<0.01)。右方移動型の AI の化学療法前後の変化は、おの 2.49±1.94%, 3.49±2.03% であった (p<0.01)。無効型の AI の化学療法前後の変化は、おの 1.12±1.11%, 1.50±1.38% であった (p<0.01) (表 4)。

4. 細胞動態の制御「無効型」の術前予測

増殖動態の「無効型」を予測するために、生検時の G 分類、臨床病期、MI、超 4c 率、AI の 5 項目を共変量として多変量 logistic 回帰分析を行ったところ、独立因子として選

表5 無効型の予測因子：logistic 回帰分析による多変量解析

因子	回帰係数	オッズ比 (95%信頼区間)	p 値
AI	-1.1304	0.3229 (0.1417-0.7357)	0.0071
超4c率	0.0741	1.0769 (1.0076-1.1508)	0.028
MI	0.3783	1.4598 (0.3053-6.9814)	0.6356
分化度	-1.2461	0.2876 (0.0268-3.0915)	0.3037
臨床病期	-0.9596	0.3830 (0.479 -3.0607)	0.3655

択されたのは超4c率およびAIであった(表5)。

考 察

口腔癌の術前化学療法の制癌効果の判定は、一般的には切除標本での残存癌細胞の量的割合と形態学的変化の所見に基づいて行われる²⁰⁻²²⁾。しかしその結果が予後を反映しないことをしばしば経験する。化学療法剤による制癌効果は、癌の増殖動態の制御を反映すると考えられ、術前化学療法前後の細胞集団の増殖動態の変化を定量的に解析することはより精度の高い判定法となり、根治手術の予後あるいは後療法の選択に資することが大きいと考えられる。これらの考えに基づいた当教室の一連の検討により術前化学療法による口腔扁平上皮癌の増殖動態の推移は、細胞核DNA量と核分裂指数の変化から3型に分類された。すなわち、1.細胞回転のG0/G1期細胞の蓄積と考えられるもの(左方移動型)、2.S/G₂期蓄積と考えられるもの(右方移動型)、3.細胞回転からは効果の乏しいと考えられるもの(無効型)である。本研究ではこれらの増殖動態の推移の様相とアポトーシス細胞の発現との関連を検討した。

本研究における化学療法前の生検組織のAIをみると、最小0.2%から最大7.9%にわたり、症例によってかなり多彩なことが観察され、他臓器の癌における結果とほぼ一致していた^{11, 12, 15)}。さらに術前化学療法後のAIの推移では、大部分の症例で多かれ少なかれAIの上昇が観察され、化学療法剤によるアポトーシスの誘導が関与したものと推測された。これらの多彩なAIの推移を増殖動態の推移の様相別にみると、「左方移動型」または「右方移動型」を示した腫瘍は「無効型」に比較して、化学療法前のAIが高値を示し、化学療法後のAIは著明に上昇した。術前化学療法後のアポトーシス細胞の発現の局在を形態学的に観察すると、腫瘍胞巣中心部の有核の角化細胞に観察されるものと特定の局在はなく散在性にみられるものがみられた。増殖動態の様相別に化学療法後のアポトーシスの発現をみると、「左方移動型」では前者が多くみられた。

培養細胞を用いた実験において、ある種の化学療法剤によってG2/M arrestとアポトーシスが誘導されることが示されている^{23, 24)}。臨床材料において、このようなことが示された研究はこれまでのところみられない。しかし、化学療法後、G2期蓄積と考えられる増殖動態の推移を示した腫瘍にもアポトーシス細胞の増加がみられたという本研究における結果は、前述の実験成果を臨床的に裏付けたものといえよう。一方、「無効型」においても、AIの上昇がみられた。しかし化学療法前の生検組織におけるAIは他のタイプと比較して有意に低く、化学療法後も低値を示した。アポトーシス細胞の誘導が1つの化学療法効果とするならば、AIの推移の面からも効果が乏しいことが示された。Bandohら¹⁷⁾も同様に、上顎洞癌において低AI例が、術前化学療法効果の乏しいことを報告している。またWheeler²⁵⁾らは頭頸部癌に対する放射線療法の検討を行い、低AI例はその効果が乏しいことを報告している。さらに低AI例は、予後不良とする報告^{17, 25, 26)}が多い。

口腔癌の細胞核DNA量と予後との関連については、細胞核DNA量が多い症例の治療成績が不良であるとされている^{27, 28)}。本研究の対象症例を仲盛¹⁸⁾の報告に従って、超4c率の10%以上群と未満群に分類し、成績をみると、やはり10%未満群の方が有意に良好であった。超4c率10%未満群では術前化学療法による増殖動態の推移の「無効型」はみられず、いずれも80%以上ときわめて良好な治療成績であった。一方、10%以上群では「左方移動型」と「右方移動型」の治療成績はいずれも70%以上と比較的良好であるのに対し、「無効型」では35%と不良であった。言い換えると、「無効型」を示した腫瘍では、術前化学療法の意義が乏しいばかりか、患者の生命予後にとって負の要因をもっている可能性すら考えられる。したがって、術前化学療法の施行に先だって、このような「無効型」となる可能性の高い腫瘍の術前予測が重要となる。そこで、本研究の検討した各種、臨床、病理学的所見によって「無効型」の予測がどこまで可能かを多変量解析によって検討した。その結果、最終モデルに残った因子はAIと超4c率であった。AIに関するこの結果は、Bandohら¹⁷⁾も多変量解析を用いた

種々の因子と予後との関係を検討したなかで、AIが唯一独立した予後因子であったと報告している。

すなわち、治療前の生検組織におけるAIが低く、超4c率が高い腫瘍は、現行の術前化学療法には癌の増殖動態からみて無効の難治癌と予測される。今後、このような難治癌に対する治療法の開発が重要課題と考える。

結 語

口腔扁平上皮癌87例を超4c率10%未満群と以上群に分けて、術前化学療法前後の核DNA量、MI、AIを測定し細胞動態の変化に基づく術前化学療法効果の検討を行い以下の結果を得た。

1. 超4c率10%未満群は39/87例で、超4c率10%以上群は48/87例であった。超4c率10%以上群は10%未満群に比較して、進展癌が多く、悪性度の高い症例が多く認められた。

2. 超4c率10%未満群(n=39)の増殖動態の変化は左方移動型23例、右方移動型16例であった。いずれの症例において、化学療法後にAIの上昇が認められた。

3. 超4c率10%未満群の5年累積生存率は91.0%であった。増殖動態の変化では左方移動型88.2%、右方移動型93.8%であった。

4. 超4c率10%以上群(n=48)の増殖動態の変化は左方移動型19例、右方移動型13例、無効型16例であった。いずれの症例においてもAIの上昇が認められたが、無効型では化学療法前から低値を示す症例が多く化学療法後も著明な上昇が認められなかった。

5. 超4c率10%以上群の5年累積生存率は62.1%であった。増殖動態の変化では左方移動型76.4%、右方移動型74.0%、無効型35.4%であった。

6. logistic回帰分析による多変量解析の結果、増殖動態の制御「無効型」を予測する独立因子として超4c率およびAIが選択された。

以上より口腔癌の術前化学療法効果に、核DNA量、MI値の変化とともに、アポトーシスの誘導による増殖制御が関与していることが示唆された。

引 用 文 献

- 1) 甲能直幸, 北原 哲: 化学療法の位置付け. 癌と化学療法 28: 448-453 2001.
- 2) Hemmer, J., Kreidler, J., et al.: Monitoring of intra-arterial treatment with epirubicin and cisplatin in oral carcinoma by DNA flow cytometry. *Chemotherapy* 37: 150-156 1991.
- 3) Hemmer, J., Kreidler, J., et al.: Monitoring of

anticancer drug effects in vivo by serial DNA flow cytometry of oral carcinomas treated by intra-arterial 5-fluorouracil/cisplatin induction chemotherapy. *Anticancer Res* 14: 2077-2084 1994.

- 4) Welkoborsky, H.J., Mann, W.J., et al.: DNA measurements for monitoring chemotherapy in advanced head and neck carcinomas. *Head Neck* 16: 240-245 1994.
- 5) Kigawa, J., Kanamori, T., et al.: Response rate and cell-cycle changes due to intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin and bleomycin for locally recurrent uterine cervical cancer. *Am J Clin Oncol* 15: 474-479 1992.
- 6) Kubota, K., Kajiura, N., et al.: Effects of pre-operative chemotherapy on DNA ploidy patterns, cell cycle, and histological findings in gastric and colonic cancer patients. *J Surg Oncol* 57: 222-229 1994.
- 7) 金城尚典, 野口 誠, 他: 核DNA量の画像解析法を用いた口腔癌の術前化学療法効果の評価. 札幌医誌 69: 45-54 2000.
- 8) 野口 誠, 金城尚典, 他: 口腔扁平上皮癌の核DNA量と核分裂指数の変化に基づく術前化学療法効果. 口科誌 50: 10-18 2001.
- 9) Noguchi, M., Kinjyo, H., et al.: Control of cell proliferation kinetics of tumor in neoadjuvant chemotherapy for advanced oral squamous cell carcinoma and its prognostic implications. *Int J Clin Oncol* 7: 138-144 2002.
- 10) Doi, R., Makino, T., et al.: Pre-operative radio-chemotherapy enhances apoptotic cell death in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 27: 382-387 1998.
- 11) Sugamura, K., Makino, M., et al.: Increased induction of apoptosis of human gastric cancer cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil. *Cancer* 79: 12-17 1997.
- 12) Osaki, M., Tatebe, S., et al.: 5-Fluorouracil (5-FU) induced apoptosis in gastric cancer cell lines: role of the p53 gene. *Apoptosis* 2: 221-226 1997.
- 13) Chaeles, A.V., Chang, H.C., et al.: Apoptosis induced by X irradiation of rec-myc cells is postmitotic and not predicted by the time after irradiation or behavior of sister cells. *Cancer Res* 56: 4116-4118 1996.
- 14) Petrash, S., Reinacher-Schick, A., et al.: Neoadjuvant, hyperfractionated irradiation induces apoptosis and decreases proliferation in squamous cell cancer of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 29: 285-289 2000.
- 15) Sugamura, K., Makino, M., et al.: Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil. *Cancer* 79: 12-19 1997.
- 16) Ohno, T., Nakano, T., et al.: Bax protein ex-

- pression correlates with radiation induced apoptosis in radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer* 83: 103-110 1988.
- 17) Bando, N., Hayashi, T., et al.: Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Cancer* 94: 1968-1980 2002.
- 18) 仲盛健治, 野口 誠, 他: 口腔扁平上皮癌の核 DNA 量測定 of 臨床的意義 - 癌浸潤様式別の超 4C 率について - . *札幌医誌* 64: 65-75 1995.
- 19) Gavrieli, Y., Sherman, Y., et al.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501 1992.
- 20) 大星章一, 下里幸雄, 他: 癌放射線療法の病理, (1) 癌組織の治癒過程の組織学的追跡 (その1). *医学のあゆみ* 61: 618-625 1967.
- 21) 小浜源郁: 口腔癌の化学療法効果に関する臨床, 病理, 細胞性免疫学的研究 - 特に臨床病理学的悪性度とブレオマイシン効果および予後について. *口科誌* 33: 672-698 1984.
- 22) 京極順二, 小田島哲世: 舌癌の術前化学療法効果に関する臨床病理学的検討 - 特に腫瘍縮小効果と組織学的効果との関連について - . *札幌医誌* 58: 317-329 1989.
- 23) Sorenson, C.M., Barry, M.A., et al.: Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 82: 749-755 1990.
- 24) Arita, D., Kambe, M., et al.: Induction of p53-independent apoptosis associated with G₂M arrest following DNA damage in human colon cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 88: 39-43 1997.
- 25) Wheeler, J.A., Stephens, L.C., et al.: ASTRO Research Fellowship: apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage IB cervical carcinoma. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32: 1487-1493 1995.
- 26) Xie, X., Clausen, O.P., et al.: The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 86: 913-920 1999.
- 27) Noguchi, M., Kinjyo, H., et al.: The tumor invasive front in oral squamous cell carcinoma: image and flow cytometric analysis with clinicopathologic correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 93: 682-687 2002.
- 28) Rubio, P.B., Nval, L.G., et al.: Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the oral cavity and tongue base. *Head Neck* 20: 232-239 1998.