

Flow cytometry を用いた腫瘍悪性度の評価

—頭頸部扁平上皮癌における転移傾向予測—

真里谷 靖

抄録 頭頸部扁平上皮癌31症例において、生検あるいは外科的切除により得られた検体を用い、Flow cytometryによる核DNA量(Ploidy levelとDNA index)およびS期細胞数の割合(%SF)についての解析を行った。そして、これらの指標とリンパ節転移との相関について検討を行った。

結果は以下の如くであった。

- 1) 腫瘍細胞の核DNA量とリンパ節転移には明らかな相関は認められなかった。
- 2) %SFはリンパ節転移と有意の相関($p < 0.01$)をもっており、この相関は、臨床経過の長さあるいは腫瘍のheterogeneityの影響をあまり受けないと考えられるT1, 2症例において顕著であった($p < 0.005$)。
- 3) 病理組織学的悪性度評価(分化度)とリンパ節転移には統計学的に有意の相関は認められなかった。しかし、同じ分化度の症例においては%SFが高くなるほどリンパ節転移が多い傾向が認められた。

以上の結果より、Flow cytometric DNA analysisにより得られる%SFは、リンパ節転移傾向の指標として有用であり、病理組織学的評価を補う悪性度の指標となり得ると考えられた。

弘前医学 40:477-488, 1988

Key words: flow cytometry, squamous cell carcinoma of the head and neck, lymph node metastasis

EVALUATION OF MALIGNANT POTENTIAL OF TUMOR BY FLOW CYTOMETRY

—Estimation of Metastatic Tendency in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck—

YASUSHI MARIYA

Abstract Specimens of tumor were obtained by tissue biopsy or surgical resection in 31 patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Those specimens were analyzed for DNA content (ploidy level and DNA index) and percentage of S-phase fraction (%SF) by Flow cytometry and the correlation between these indices and lymph node metastasis was evaluated.

The results are as follows:

- 1) There was no significant correlation between DNA content and lymph node metastasis.
- 2) %SF correlated significantly ($p < 0.01$) with lymph node metastasis, and its correlation was eminent ($p < 0.005$) in T1 and 2 cases, which were considered not so influenced by the disease course and tumor heterogeneity.
- 3) There was no significant correlation between histopathological grade of malignancy and lymph node metastasis. However, in the cases of the same grade there was a tendency that the higher the %SF was the more frequent the lymph node metastases were.

These results show the usefulness of %SF calculated by Flow cytometric DNA analysis as the index of lymphatic metastatic tendency, making up for the histopathological evaluation of malignancy.

Hirosaki Med. J. 40:477-488, 1988

弘前大学医学部放射線医学教室(主任 竹川鉦一教授)

昭和63年6月24日受付

Department of Radiology, Hirosaki University School of Medicine (Director: Prof. S. TAKEKAWA), Hirosaki, Japan

Received for publication, June 24, 1988

I. はじめに

悪性腫瘍の治療においては、原発巣の治療と共にリンパ節転移あるいは遠隔転移の治療・予防が重要な意味を持つ。病巣の拡がりを実に評価すると同時に、腫瘍の臨床的悪性度、特に転移傾向をあらかじめ予測し、これを考慮しつつ治療を進めることが、予後の改善を図る上で重要である。

近年、このような腫瘍悪性度の判定における、flow cytometry (以下 FCM と略す) の応用が注目されている。FCM の高度の処理能力は、腫瘍細胞の核 DNA 量測定、細胞動態解析等を迅速かつ高い定量性、客観性をもって可能ならしめているが、従来の病理組織学的評価に加え、これらの新たな指標を導入することによって、腫瘍の悪性度をより詳細に把握することが期待される。

そこで筆者は、頭頸部扁平上皮癌の悪性度評価における FCM の有用性を知ることを目的として、FCM により得られる指標 (DNA aneuploidy の有無および程度、S 期細胞数の割合) と腫瘍の転移傾向の関連について検討

を試みた。転移傾向の臨床的目安としては頸部リンパ節転移に着目し、リンパ節転移傾向予測における FCM の有用性について検討した。

II. 対象

1986年4月より1987年10月までの間に、弘前大学医学部附属病院放射線科で放射線治療あるいは癌化学療法を施行した頭頸部扁平上皮癌31例 (男子23例, 女子8例) を対象とした。年齢は28歳から83歳 (平均年齢59.3歳) で、初回治療例が29例, 再発例が2例であった。再発例はいずれも初診時リンパ節転移がなく、初回治療でCRの評価を得た後6カ月以上経過した症例で、検体採取前3カ月間に放射線治療あるいは抗癌剤投与を受けていない。

原発部位別、および UICC⁶⁾, JJC⁷⁾ (上顎癌のみ) の TNM 分類に従った病期別の症例構成を Table 1 に示す (再発例は rTNM 分類として再評価した)。症例は口唇・口腔癌16例, 上咽頭癌3例, 中咽頭癌6例, 下咽頭癌1例, 上顎癌3例, および喉頭癌2例より成っている。

Table 1. Primary sites and TNM classifications of tumors of the head and neck.

Primary site	T	N0	N1	N2	N3	Total
Lip and Oral cavity	T1	2				2
	T2	7		2	1	10
	T3		1	1		2
	T4			1		2
Epipharynx	T2				1	1
	T3		1		1	2
Mesopharynx	T3	3(1)	1			4(1)
	T4	1(1)			1	2(1)
Hypopharynx	T3				1	1
Maxillary sinus	T3		1			1
	T4	2				2
Larynx	T2	1				1
	T3	1				1
Total		17		14		31

TNM classification.: UICC⁶⁾ and JJC⁷⁾ (only in carcinoma of maxillary sinus). In parentheses are recurrent cases.

Table 2 Histologic grades of tumors of the head and neck

Histologic Grade	No. of Case
Poorly differentiated SCC	9
Moderately differentiated SCC	11
Well differentiated SCC	11
Total	31

SCC: Squamous cell carcinoma.

る。リンパ節転移陽性(N+)群は14例で、このうち10例は周囲に固着している(N3)か、あるいは組織学的に転移を確認している症例であるが、4例は臨床的に転移があると判断したN1あるいはN2症例である。臨床的にリンパ節転移陰性と診断されたN-群は17例であり、同群では、その後の観察でもリンパ節転移の出現をみていない(観察期間2~20ヵ月)。治療前に既に遠隔転移を認めたのは下咽頭癌の1例のみであり、同症例にはリンパ節転移(N3)が同時に認められた。

また、分化度からみた症例構成をTable 2に示す。高分化型扁平上皮癌11例、中分化型扁平上皮癌11例、低分化型扁平上皮癌9例よ

り成っている。

III. 方 法

1. Single cell suspension の作成

Fig. 1 に試料作成の概要を示す。

材料は治療開始前に腫瘍部から肉眼あるいはファイバースコープ下で生検鉗子により直接採取するか、あるいは(術後照射例では)腫瘍摘出時に切離された新鮮標本から採取することにより得られた。何れの場合も明らかに腫瘍であると思われる部位より採取した。採取された組織片は半切し、一方をFCM用材料として使用すると共に、他方を病理組織標本として用い、腫瘍組織であることを光頭的に確認した。

FCM用材料は、壊死巣、出血巣を除去して生理的食塩水で洗浄した後、時計皿に移し、生理的食塩水を少量加えて眼科用剪刀と注射針により、組織片が各々直径0.5mm程度あるいはそれ以下となるまで細片した。次いで細切片の浮遊液を試験管内に移し、10% fetal bovine serum (GIBCO) 中に dispase (合同

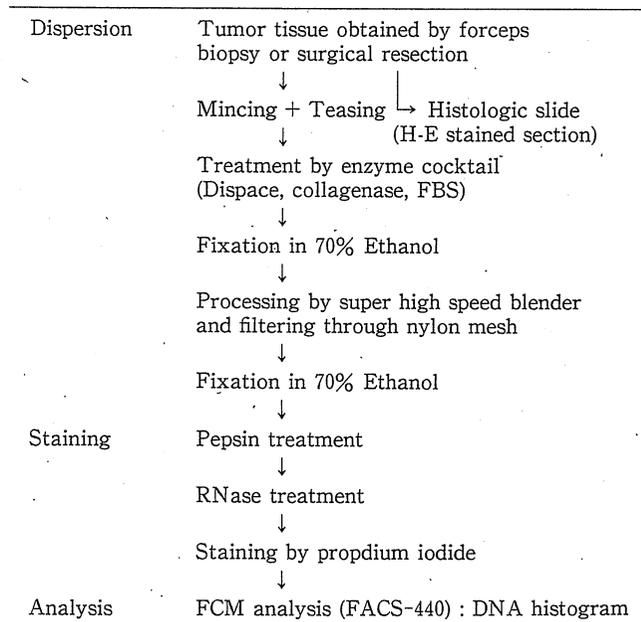


Fig. 1 Methods for preparing samples.

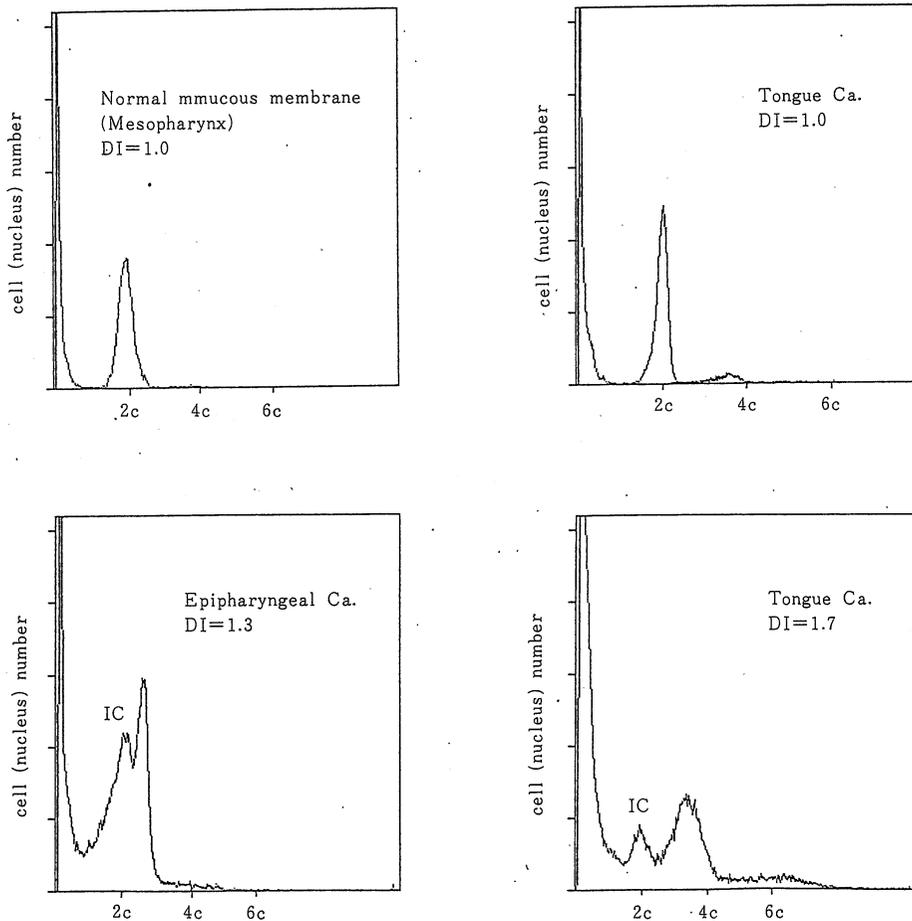


Fig. 2 DNA histograms of normal tissue (a), diploid tumor (b), and aneuploid tumors (c, d).

DI : DNA Index

IC : Internal control (Human lymphocyte)

酒精；2,000 u/ml) と collagenase (和光純薬；0.1%) とを添加した酵素カクテルを 10 ml 加え, water bath にて 37°C で約 3 時間 incubation した。

酵素処理後, リン酸緩衝液 (0.01M, pH 7.2 ; 以下 PBS と略す) による洗浄を 2 度繰り返した後, 70% 冷エタノールで固定した。5°C の低温下に約 2 時間静置した後, 高速ブレンダー (Waring 社 31BL91 ; 14,700 rpm, 5 秒間) 処理し, さらに 70 μ ナイロン・メッシュで濾過した。顕微鏡下に単離化を確認した後遠沈し, 70% 冷エタノールで再固定した

上で測定時まで冷所 (5°C) 保存した。保存期間は 1 週間以内とした。

2. 核染色

Propidium iodide (以下 PI と略す⁸⁾) による核染色は, 毎回測定直前に行った。

固定, 保存されていた single cell suspension を PBS で洗浄後, 0.1% pepsin 溶液 (和光純薬 ; 0.2% HCl 水溶液, 対タンパク消化力 1 : 10,000) を 10 ml を加え, water bath にて 37°C, 15 分間 incubation し, 裸核処理した。さらに ribonuclease 溶液 (SIGMA ; 1 mg/ml distilled water) 10 ml を加え, water

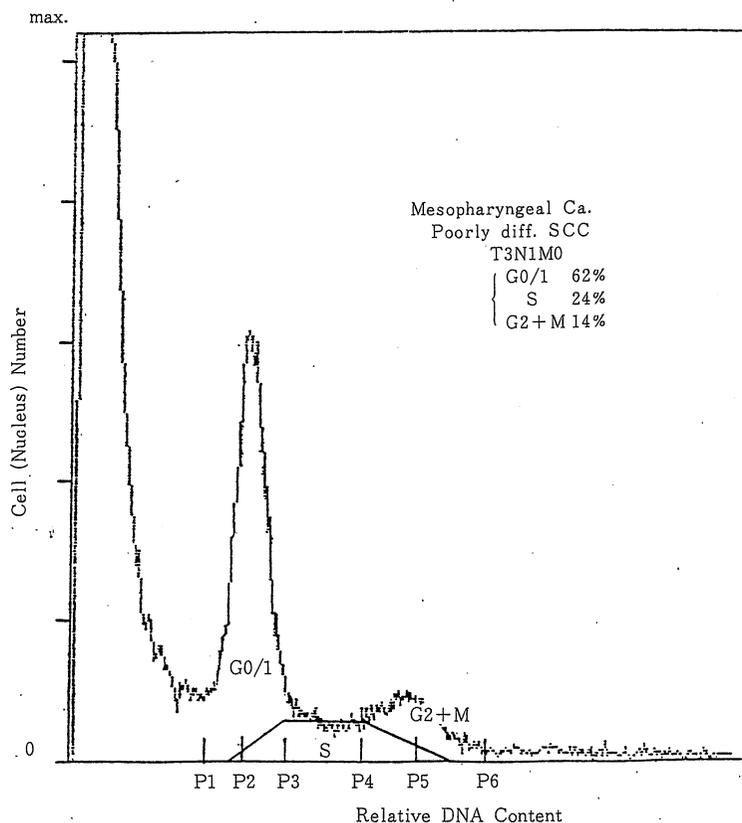


Fig. 3 One example of cell cycle analysis by practical graphical method.

bath にて 37°C, 15分間 incubation し, RNA を除去した. PBS にて洗浄後, PI 溶液 (PI 50 μg/ml トリス塩酸緩衝液 0.05 M, pH 7.6) を加え, 30分間室温 (暗所) にて蛍光染色した. 染色後さらに 70 μ ナイロン・メッシュで濾過した.

3. 測定

測定装置は, Becton-Dickinson 社製 FACS-440 を使用した. アルゴンイオンレーザーを 488 nm に最大強度を持つ単色光に調整し, これによって細胞核 2 本鎖 DNA に intercalate している PI を励起し, 個々の細胞核より発する蛍光 (前方散乱光) の強度を 580 long pass filter を用いて 580 nm 以上 (赤色蛍光) の領域で測定した. そのパルス波高値を A/D 変換し, 0-256 の各チャンネル毎

にカウント数即ち細胞 (核) 数として加算していくと, 蛍光強度即ち相対的 DNA 量を横軸, 細胞 (核) 数を縦軸とするヒストグラムが得られる. これを NEC 社製マイクロコンピュータ PC-9801F を用いてデータ処理し, DNA ヒストグラムとして表示した. なお, 測定細胞 (核) 数は最低でも 2 万個以上とした.

4. DNA ヒストグラムの解析

DNA ヒストグラムの解析は, 以下の 2 点について行った.

- 1) DNA aneuploidy の有無の判定, および DNA Index (以下 DI と略す) の算定.
- 2) 全腫瘍細胞中に占める S 期細胞数の割合 (以下 %SF と略す) の算定.

DNA aneuploidy の有無については, Society for Analytical Cytology の試案²⁾に従い判

定した。即ち、正常2倍体細胞（正常ヒトリンパ球=Internal control）のピークと異なるピークを持つ場合のみを DNA aneuploidy として表現した。DIについては、正常ヒトリンパ球の DNA 量に対する試料の最大 (G0/G1) ピークの DNA 量の比として求めた。正常ヒトリンパ球のピークは50チャンネル前後に設定した。Fig. 2 にその具体例を示す。

%SF は、RITCH らの practical graphical method を用いて求めた。Fig. 3 に同法を用いて実際に細胞周期を解析した例を示す。%SF は、ヒストグラム中に占める S 期の面積の割合として示される。

5. リンパ節転移との相関についての検討
上述の方法により得られた腫瘍悪性度の指標と、リンパ節転移との相関について検討を行った。

統計学的有意差の判定には、Wilcoxon 検定および χ^2 検定を用いた。

IV. 結 果

1. DNA aneuploidy および DNA Index (DI)

DNA aneuploidy を示した腫瘍は、31例中25例 (81%) であった。DNA aneuploidy の出現頻度は、N-群では17例中14例 (82%)、N+群では14例中11例 (79%) と 2 群間に差を認めなかった。

DIの全体での平均は 1.28 ± 0.32 (mean \pm S.D. 以下同様)、最大値は2.1、最小値は0.8であった。

リンパ節転移との関連をみると、N+群で 1.26 ± 0.34 、N-群で 1.29 ± 0.30 と 2 群間で DI に差を認めなかった (Fig. 4)。

G0/G1 ピークが2つ以上認められたのは、1例のみであり、DNA 量からみた多クローン性と転移の関係については、検討できなかった。

2. S 期細胞数の割合 (%SF)

%SFの全体での平均は、 $18.5 \pm 7.7\%$ 、最大で35%、最小で8%であった。

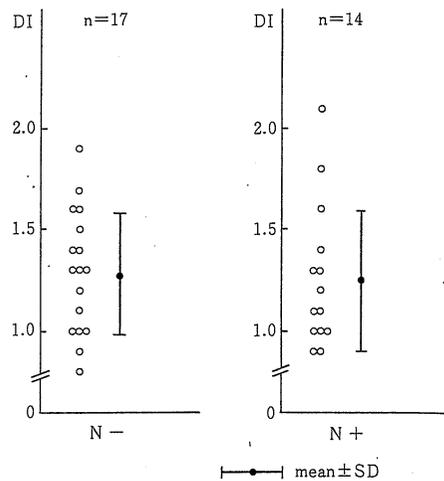


Fig. 4 Correlation between DNA Index (DI) and lymph node metastasis.

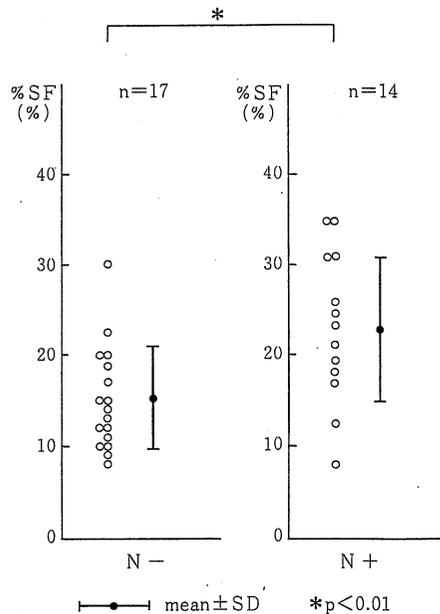


Fig. 5 Correlation between %SF and lymph node metastasis.

N+群、N-群に分けて検討してみると、N+群では、 $22.7 \pm 7.9\%$ 、N-群では $15.1 \pm 5.5\%$ と N+群で %SF は明らかに高値を示し、統計学的にも有意であった (Wilcoxon 検定; $p < 0.01$, Fig. 5)。

ここで、リンパ節転移に於ける原発巣の局

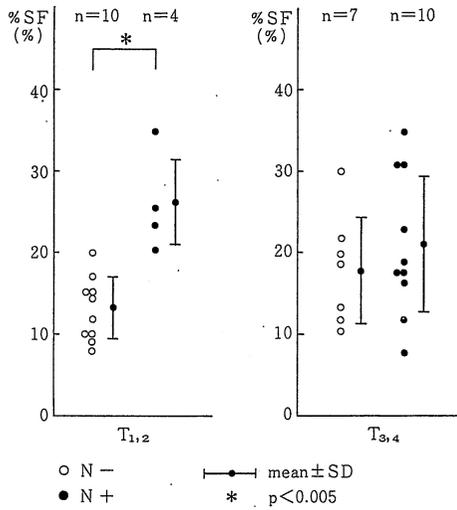


Fig. 6 Correlation between %SF and lymph node metastasis in view of T-classification.

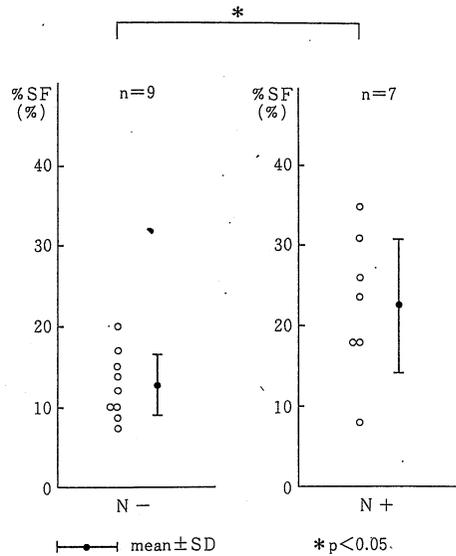


Fig. 7 Correlation between %SF and lymph node metastasis in carcinomas of lip and oral cavity.

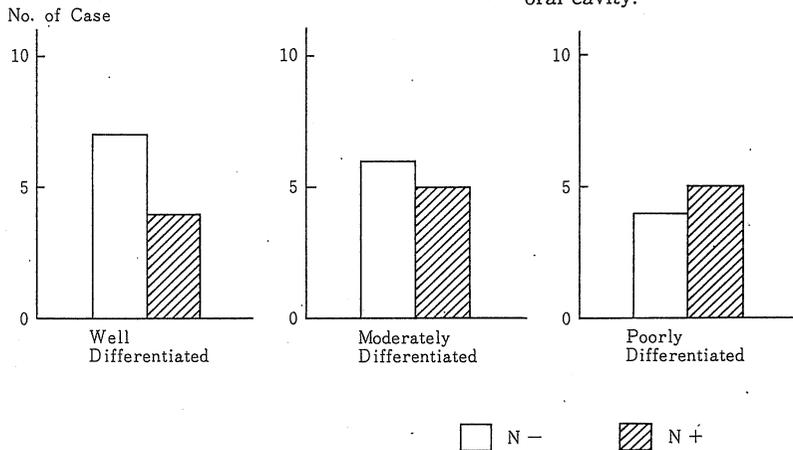


Fig. 8 Correlation between histologic grade and lymph node metastasis.

所進展度の影響を考慮するために、症例を T1, T2 群と T3, T4 群の 2 群に分けた上で、%SF とリンパ節転移の相関を検討したのが、Fig. 6 である。T1, T2 群では、14 例中 4 例の N+ 例において %SF が有意に高く (Wilcoxon 検定; $p < 0.005$)、原発巣の局所進展が進行していない場合でも %SF が高値を示す症例では、リンパ節転移が多いことを示す。T3, T4 群でも、N+ 例において %

SF が高い傾向は、T1, T2 群同様認められた。しかし、N+, N- 間での %SF の差は減少しており、この差は統計学的に有意ではなかった。

さらに、同一部位で症例数の多かった (16 例) 口唇・口腔癌について同様の検討を試みた (Fig. 7)。N+ であった 5 例は、N- 例に比して %SF が有意に (Wilcoxon 検定; $p < 0.05$) 高く、口唇・口腔という一部位に限局

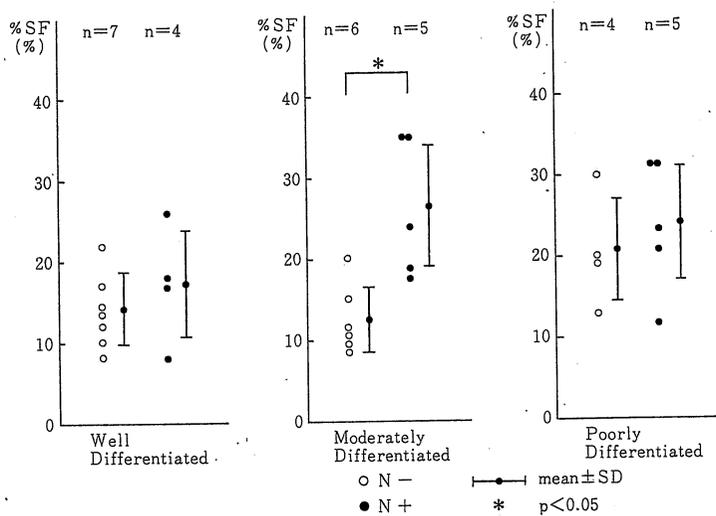


Fig. 9 Correlation between %SF and lymph node metastasis in view of histologic grade.

しても、%SFとリンパ節転移の相関が認められた。その他の部位では、各々の症例数が少ないため検討はできなかった。

3. 腫瘍の分化度

腫瘍の分化度とリンパ節転移の関連を検じた結果を Fig. 8 に示す。分化度の高い症例で転移が少ない傾向はみられるものの統計学的に有意ではなく、分化度とリンパ節転移には明らかな相関はないという結果であった。

次いで、各分化度ごとに %SF とリンパ節転移の関係を検討した結果を Fig. 9 に示す。各々の分化度において、N- 例に比べて N+ 例の %SF が高い傾向が認められ、特に中分化型では統計学的に有意であった。即ち、分化度とリンパ節転移には有意の関連はないが、同程度の分化度の症例では %SF が高いものにリンパ節転移が多いという傾向が得られた。この様な観点からみた代表的な例を Fig. 10 に示す。

なお、腫瘍の分化度と %SF の間には、ある程度の相関があり、高分化型と低分化型の %SF には統計学的有意差を認めた (Wilcoxon 検定; $p < 0.05$)。分化度と DI の間には一定の傾向を認めなかった。

V. 考 案

1. DNA aneuploidy および DI

癌細胞にみられる特徴の一つとして、染色体に異常が存在することはよく知られた事実である。¹⁰⁾ このうち、染色体の量的異常は DNA aneuploidy として把握することが可能であり、その程度は DI として示される。

DNA aneuploidy あるいは DI とリンパ節転移の関連については、既に阿部らが乳癌について報告しており、aneuploidy の出現頻度は病期が進むほど高い傾向にあるとしている。また、吉川は、¹²⁾膀胱癌における DI と Grade, Stage との関連について述べている。このほかにも、DNA aneuploidy あるいは DI と予後の関連などについて述べている報告も多く、¹³⁻¹⁵⁾これらの報告では、DI の悪性度の指標としての有用性を認めている。

しかし、筆者の検討では、頭頸部扁平上皮癌において、DNA aneuploidy の有無あるいは程度とリンパ節転移に明らかな相関は存在せず、また、N+ 群と N- 群の 2 群間において DI に有意の差は認められなかった。即ち DNA aneuploidy の有無あるいは DI は、リンパ節転移からみた腫瘍の転移傾向予測の

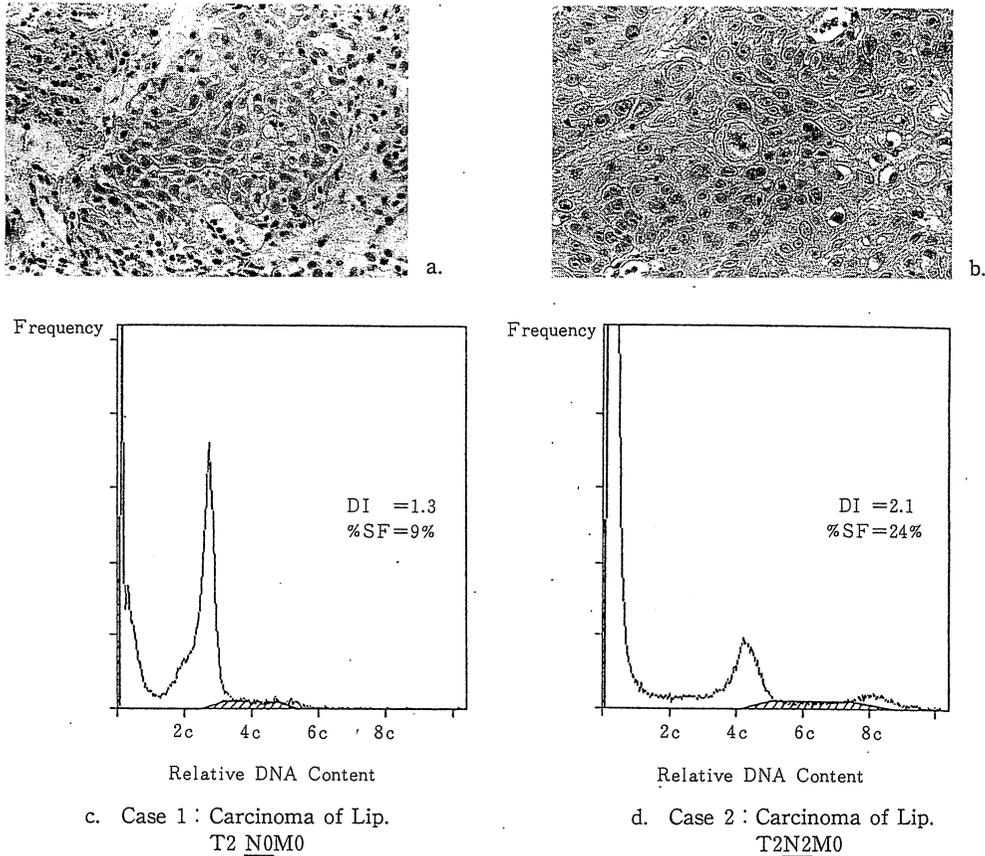


Fig. 10 Comparison between 2 cases of carcinoma of lip. Both cases are classified as T2, and graded as moderately differentiated squamous cell carcinoma according to histologic findings (a : Case 1, b : Case 2). However, DNA histograms show the significant difference of %SF between negative lymph node case (c : Case 1) and positive lymph node case (d : Case 2).

指標としての意義は少ないものと考えられたが、症例数がさらに増えた時点で、再度検討の余地があるものと思われた。

2. S 期細胞数の割合 (%SF)

腫瘍組織の増殖能を推定する手段として従来用いられてきたのは、腫瘍細胞中の M 期細胞の割合を光顕的に算出する mitotic index および autoradiography を用いた labeling index であった。しかし、これらは算出に長時間を要すること、あるいは人体被曝のあること等から臨床応用には向いていなかった。

これに替わるものが、FCM を用いた細胞周期解析である。この解析によって得られる %SF は、labeling index と同様の意味を持ち、腫瘍組織の増殖相や細胞世代時間¹⁶⁾を反映する生物学的悪性度の指標とされる。

%SF とリンパ節転移の関連については、乳癌¹¹⁾、甲状腺癌¹⁷⁾などの腫瘍で既に検討されている。阿部¹¹⁾らは、乳癌においてリンパ節転移陽性群の %SF が高いことを示し、%SF はリンパ節転移からみた乳癌の悪性度を示す良い指標であるとしている。しかし高見¹⁷⁾らの甲状腺癌における検討では、proliferative

index (S期+G2/M期細胞数の割合)とリンパ節転移には関連がなかったとしており、必ずしも一定の傾向が認められたわけではない。

筆者の検討では、頭頸部扁平上皮癌において、%SFはリンパ節転移と有意の相関を持っており、%SFの高い例にリンパ節転移が多いという結果が得られた。原発巣の進展度を考慮してもこの傾向は保たれており、特に、T1, T2症例において、顕著であった。T3, T4症例でも同様の傾向が認められたが、N+例で%SFが必ずしも高くない場合もあり、%SFとリンパ節転移の相関はT1, T2例ほど明瞭ではなかった。この場合、臨床経過の長短が少なからず影響していると考えられるが、同時に、腫瘍組織のheterogeneityの影響も考慮すべきであると考えられた。即ち、大きな腫瘍では採取部位が偶然増殖細胞の割合の低い部分であったということも起こり得るので、データの解釈には少々幅を持たせる必要があると思われた。

また、リンパ節転移では、解剖学的な条件がその発生に大きな影響を持つと考えられるため、16例と同一部位で比較的症例の多かった口唇・口腔領域に限って検討をおこなってみたが、やはり%SFがN+群で有意に高く、解剖学的条件を考慮しても、%SFとリンパ節転移の関連は保たれていた。

以上の結果より、%SFは頭頸部扁平上皮癌における転移傾向の指標として有用であり、原発巣の%SFからリンパ節転移の起こりやすさをある程度予測できるものと思われた。

原発巣での増殖能と転移の関係については以前より指摘されているが¹⁸⁾、これについては、次のような解釈が可能である。

転移の発生にとっては、腫瘍細胞の自律性・浸潤性増殖が必要条件であり、その他の条件が同様であれば、増殖のさかんなものほど転移発生の機会に富むと考えられる。また、増殖・成長に速いものは、腫瘍組織内圧の上

昇によって抵抗の弱い周囲の組織間隙に腫瘍細胞が受動的に侵入する機会を与え、転移を促進するものと考えられる。さらに、増殖相の割合が高く細胞分裂のさかんなものは突然変異の可能性が高く、好転移性クローン²¹⁾の発生に関連するものと考えられる。

現在、リンパ節転移の成立機転は、徐々に解明されつつあり、細胞形態、細胞動態、細胞表面の性状、酵素学的特徴、細胞の遊離性・運動性、宿主の免疫反応、凝固・線溶系、解剖学的条件など多方面からの検討がなされつつある。%SFは、当然ながらこのうちのごく一部しか表わしていないことは確かであるが、今回の結果より、%SFによって表現される腫瘍細胞の増殖能とリンパ節転移という現象の間につながりの存在することが臨床的に確認されたと考える。

3. 転移傾向の評価、およびその意義

舌癌では初診時N0と診断された症例の20-40%程度に潜在性のリンパ節転移が認められるとされているが^{25,26)}、他部位でも潜在性転移は決して稀でないことから、転移傾向を治療開始前に予め把握できればその臨床的意義は大きい。

頭頸部腫瘍に限らず、各領域に於いて集学的治療が確立されつつある現在、転移のコントロールは、患者の予後改善にとってますます大きな意味を持つようになってきている。ことに原発巣の制御が可能なN0症例に於いて、subclinicalな時期に微小転移巣の存在が強く疑われる症例を選択することが可能ならば、adjuvant chemotherapy, 予防的照射あるいはneck dissection等を適切に用いることによって、より一層の予後改善を望むことも可能である。^{27,28)}

この意味で、今回の結果は興味深いものと思われた。%SFがリンパ節転移傾向予測の良い指標となり得ると考えられ、従来用いられている病理組織学的評価と共に、腫瘍悪性度の目安として治療方針決定の指針となり得ると考えられた。

VI. ま と め

1. S 期細胞数の割合 (%SF) が頸部リンパ節転移と有意の相関 ($p < 0.01$) を持っていた。この相関は、局所進展度の低い例 (T1, T2) で明らかに認められた ($p < 0.005$)。

2. DI と頸部リンパ節転移には関連は認められなかった。

3. 分化度と頸部リンパ節転移には有意の関連を認めず、同程度の分化度の腫瘍では、%SF の高いものにリンパ節転移が多い傾向を認めた。

4. 以上より、転移傾向予測の指標として %SF が有用であると考えられた。

5. 分化度を中心とした従来の組織学的評価に加え、FCM を用いることで、腫瘍の悪性度をより詳細に把握し、治療成績の向上に結び付けることが可能であると考えられた。

文 献

- 1) 高本 滋, 太田和雄: フローサイトメトリー, 手技と実際. 9-22, 蟹書房, 東京, 1984.
- 2) 高本 滋, 太田和雄: Flow cytometry による腫瘍マーカーとしての異数倍数体の検索. 最新医学, 40: 104-109, 1985.
- 3) 高橋 学, 他: Bromodeoxyuridine 標識による細胞動態の解析. 最新医学, 40: 80-84, 1985.
- 4) BROEDERS, A. C.: Squamous-cell epithelioma of the lip, A study of five hundred and thirty-seven cases. J. A. M. A., 74: 656-664, 1920.
- 5) WILLEN, R. *et al.*: Squamous cell carcinoma of the gingiva. Histological grading of malignancy. Acta Otolaryngol., 79: 146-154, 1975.
- 6) Union Internationale Contre le Cancer: TNM Classification of Malignant Tumors, 3rd Ed, Geneva, 1978.
- 7) 日本頭頸部腫瘍学会: 臨床・病理・頭頸部癌取り扱い規約. 金原出版, 東京, 1982.
- 8) 野村和弘: フローサイトメトリー, 手技と実際. 69-80, 蟹書房, 東京, 1984.
- 9) RITCH, P. S. *et al.*: A practical graphical method for estimating the fraction of cells in S in DNA histograms from clinical tumor samples containing aneuploid cell populations. Cytometry, 4: 66-74, 1983.
- 10) 井坂英彦: 腫瘍病理学, 113-121, 朝倉書店, 東京, 1970.
- 11) 阿部力哉, 植木浜一: フローサイトメトリーによる乳がんの悪性度に関する研究. 病態生理, 4: 1008-1010, 1985.
- 12) 吉川和行: Flow Cytometry による膀胱腫瘍の研究, 第1報. Flow cytometric DNA analysis による膀胱癌の悪性度評価の試み. 日泌尿会誌, 76: 483-490, 1985.
- 13) 吉田 明: 甲状腺癌における核 DNA 量と悪性度についての研究. 日外会誌, 85: 1261-1273, 1984.
- 14) OLZEWSKI, W. *et al.*: Flow cytometry of lung carcinoma, A comparison of DNA stemline and cell cycle distribution with histology. Analytical and Quantitative Cytology, 4: 90-94, 1981.
- 15) BARLOGIE, B. *et al.*: Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry. Cancer Res., 38: 3333-3339, 1978.
- 16) 松谷雅生, 他: 抗 BUdR 単クローン抗体による悪性脳腫瘍の成長解析および治療への応用. がん治療のあゆみ, 第5回一般研究助成, 129-135, 財団法人がん集学的治療研究財団, 1985.
- 17) 高見 博, 他: 甲状腺腫瘍における生物学的悪性度判定の試み—フローサイトメトリーによる検索—. ホルモンと臨床, 33: 673-677, 1985.
- 18) 川口隆憲, 他: 転移性腫瘍の問題点, 病理学の立場から. 最新医学, 41: 2229-2235, 1986.
- 19) 中村久也: 腫瘍病理学, 61-72, 朝倉書店, 東京, 1970.
- 20) EAVES, G.: The invasive growth of malignant tumours as a purely mechanical process. J. Pathol., 109: 233-237, 1973.
- 21) 螺良英郎, 他: 癌転移の機構とその抑制, 臨床の立場から転移の問題点を探る. 癌と化学療法, 12: 1189-1195, 1985.
- 22) 岸野泰雄: 転移の成立機転. 臨婦産, 31: 483-487, 1977.
- 23) 須田 功, 大沢利昭: 癌細胞の特異性, 転移成立の機序. 日本臨床, 44: 367-375, 1986.
- 24) 川口隆憲, 他: 癌転移のメカニズム: 電顕的研究. 日本臨床, 45: 237-249, 1987.
- 25) 堀 信一, 他: 舌癌 Tx No 症例の頸部リンパ節転移に関する検討. 癌の臨床, 23: 507-510, 1977.

- 26) LEE, J. G. and LITTON, W. B. : Occult regional metastasis : Carcinoma of the oral tongue. *Laryngoscope*, 82 : 1273-1281, 1972.
- 27) FLETCHER, G. H. : Elective irradiation of sub-clinical disease in cancers of the head and neck. *Cancer*, 29 : 1450-1454, 1972.
- 28) SKOLNIK, E. H. : Elective neck dissection in head and neck cancer. *Arch. Otolaryng.*, 87 : 471-476, 1968