

出國報告（出國類別：訓練）

應用自體螢光設備(velscope)於口腔癌 篩檢及輔助決定手術位置與邊界

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：呂佩軒

派赴國家：加拿大

出國期間：110年12月8日至111年1月12日

報告日期：111年3月1日

目錄

摘要	1
內文	2
壹、目的.....	2
一、自體螢光設備(VELscope)輔助辨識與徹底切除病灶.....	2
二、3p、9p、17p 的基因座缺失(loss of heterozygosity, LOH)找出高風險的低度上皮變異，導引口腔癌前病變的積極治療.....	2
三、卑斯省癌症治療中心跟診，了解診斷與治療方式；癌症研究中心實地操作 3p、9p、17p 的基因座缺失(LOH)實驗	3
四、未來合作方向--小毛刷與細胞核表型分析(cytology-Nuclear phenotype Score).....	4
貳、過程.....	4
一、研究內容.....	4
i. 3p、9p、17p 基因座缺失(LOH)	4
ii. 使用高解析度光學顯微鏡做定量細胞學檢(細胞核表型分析)測 Quantitative cytology using High-resolution microscopy-cNPS(cytology-Nuclear phenotype Score).....	7
iii. 未來展望-早期抓出隱藏性淋巴結轉移(occult lymph node metastasis): 透過 DNA-image cytometry 軟體篩選出容易轉移到頸部淋巴結的高風險細胞核表型.....	9
二、臨床工作.....	12
i. 看診方式及手術.....	12
ii. 自體螢光設備(VELscope)-正常組織呈現綠色自體螢光；異常組織呈現黑色，顏色對比容易區分.....	12
iii. 甲基藍染色(Toluidine Blue Staining)找出高風險的口腔癌前病變—精準引導切片位置..	12
iv. 光動力治療(Photodynamic therapy, PDT)	14
v. 冷凍治療(Cryotherapy).....	15
vi. 未來展望-在臺灣成立癌前病變門診(dysplasia clinic).....	14
三、病理學科.....	16

參、心得.....	17
一、緣起-美國口腔病理學會年會(Academy of Oral and Maxillofacial Pathology, AAOMP).....	17
二、交流--如何想出有想有影響力的研究主題.....	17
三、自我省思與合作計畫.....	18
四、未來展望-臺大口腔外科的研究主題—應用病理切片細胞核 AI 分析預測手術前之引導性化療效果.....	18
五、致謝.....	19
肆、建議事項.....	20
伍、參考文獻.....	21

附錄

摘要

口腔癌是全球公共衛生議題，全世界平均每年新增 274,000 個案與 145,000 死亡人數。現階段治療口腔癌所遇到的問題包含：1.病灶顏色與正常組織接近，難辨識與徹底清除，局部復發率高，文獻統計口腔癌復發率為 10-30%、2.口腔癌前病變的病理低度上皮變異(**low grade dysplasia**)一部分暗藏著高癌變機率的高分險分子株(**high risk molecular clone**)，目前病理診斷缺乏分子生物學癌變風險(**molecular risk**)資訊，易錯失早期給予低傷害性治療的機會、3.初期口腔癌的隱性頸部淋巴轉移(**occult lymph node metastasis**)難以預測，易錯失治療先機，影響存活率。此次來到加拿大卑斯省的癌症研究中心學習使用 **VELscope**、最新用來分析癌前病變高分險分子株的技術、以及參與小毛刷口腔篩檢後的細胞核型態分析與使用病理標本細胞核型態分析來預測隱性頸部淋巴轉移。

本文:

壹、目的

一、自體螢光設備(VELscope)輔助辨識與徹底切除病灶

口腔癌是第六常見的癌症為世界重要公共衛生議題，居臺灣男性癌症十大死因的第七位，儘管現代醫學發展日新月異，在過去五十年口腔癌的存活率仍然維持在 30-60%[1]，口腔癌的治療目前還是仰賴徹底的手術切除癌細胞，然而口腔黏膜顏色為紅色而大部分的口腔癌與癌前病變也呈現紅色，增加了辨識與完整切除的困難度。近年來由加拿大卑斯省的癌症研究中心(BC Cancer Research Centre, BCCRC)研發出自體螢光設備(VELscope)對於偵測口腔癌、原位癌與高度上皮變異之癌前病變有將近 100%的敏感度，透過自體螢光設備(VELscope)正常的組織為綠色，而病灶組織則為黑色，顏色對比鮮明可用於輔助決定手術位置與邊界和口腔癌篩檢。另外由於長時間暴露致癌物質(菸，酒，檳榔)所導致的口腔上皮區域癌化，許多低度上皮變異或組織學正常的口腔黏膜已經具有容易癌變的基因變異，例如 3P、9P、17P 的基因座缺失，成為日後復發的隱憂。近年來的文獻指出自體螢光設備(VELscope)也有助於早期偵測這類高風險的基因改變[2]。臨床研究發現螢光目視法來輔助決定手術邊界可以顯著的降低初期口腔癌與高度上皮變異的癌前病變之局部復發率[3]。因此自體螢光設備(VELscope)的應用很值得我們去當地學習之後在臺灣好好推廣。

二、3p、9p、17p 的基因座缺失(loss of heterozygosity, LOH)找出高風險的低度上皮變異，導引口腔癌前病變的積極治療

口腔癌是以抑癌基因(tumor suppressor gene, TSG)的突變為主，抑癌基因 TSG 突變之後，另外一對偶(allele)的正常基因會代償它該有的功能，但若另外一個好 allele 也產 allele reduction 造成基因座缺失(loss of heterozygosity, LOH)就會開始生成腫瘤，這是我們所熟知的 Knudson 在 1985 年提出的“2-Hit Hypothesis”。口腔癌常見的 LOH 之基因包含以下九個: 9p171, 9 p1748, 9p1751, IFNA, 3 p1300 sh, 3 p1234, 3 p1228, 17 p786, CHNRB1 分別坐落在 3、9、17 號染色體的 P 臂(P arm)上，研究指出許多低度的上皮變異(low grade dysplasia)或者是疣狀上皮增生(verrucous hyperplasia)就已經開始具有 3p、9p、17p 的基因座缺失(LOH)，卑斯省癌症中心(BCCRC)的研究團隊率先做了大規模的回溯性研究(retrospective study)，發現利用分析癌前病變的 3p、9p、17p 基因座缺失(LOH)可以有效的早期找出高癌變風險的病灶[4, 5]。按照我過去所學，病理組織學的高度上皮變異的癌前病變大約有 30-45% 三年之後會進展成口腔癌，而低度上皮變異大約只有 5-15% 最終會繼續進展惡化，朴芳瑀(Catherine F. Poh)教授的研究指出有 9 p21 and/or 3 p14 and 17 p13 的基因座缺失的低度上皮變異有大於 50%的機率五年內將會變成口腔癌，有這樣基因變化的低度上皮變異若是長在舌頭上進展成癌症的機率更是高達 98.4%[1]。

在十幾年前此類低度癌前病變的處理通常就是“wait and see”定期回診觀察是否有變化，但

有了分子生物學的了解後，未來我們可以透過分子生物學的分析挑出這些擁有 3p、9p、17p 的基因座缺失的高風險低度上皮變異，早期積極給予處理，畢竟他們的癌變機率是等同於甚至大於高度上皮變異。

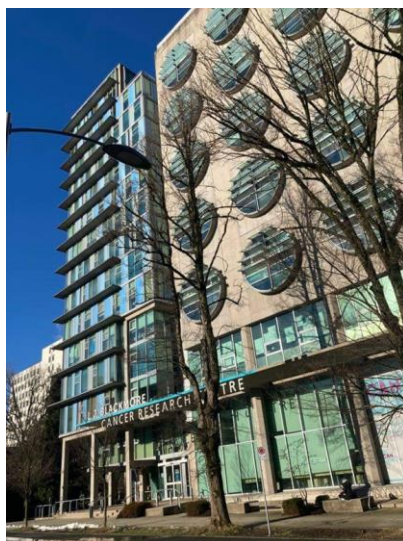
目前朴醫師處理癌前病變的方式類似於臺大口腔外科主要就是三項 1. 光動力 2. 冷凍 3. 手術切除，朴醫師為臺大牙醫系校友幾年前曾經回臺大口腔外科向前牙醫專業學院江俊斌院長學習光動力治療和冷凍治療，朴醫師目前是全北美唯一一位有在做光動力治療的醫師，然而她的光動力治療方式有經過改良與臺灣用的稍有不同。這後面會一一細述。

總之，透過基因做缺失(LOH)找出這些擁有高風險分子株的低度上皮變異(low grade dysplasia, high molecular risk)會是未來口腔癌前病變診斷的趨勢，值得參與並引進臺灣。

三、 卑斯省癌症治療中心(BC Cancer Agency)實地跟診了解診斷與治療方式；癌症研究中心(BC Cancer Research Centre, BCCRC)操作 3p、9p、17p 的基因座缺失(LOH)實驗



BC Cancer Agency



BC Cancer Research Centre



卑斯省癌症中心(BCCRC) 訪問科學家識別證

此次出國訪問主要是實地走訪加拿大卑斯省的癌症治療中心(BC Cancer Agency)，癌症

研究中心(BC Cancer Research Centre, BCCRC)，加入朴芳瑀教授(Dr. Catherine F. Poh)所帶領的研究團隊擔任訪問科學家(visiting scientist)。該癌症中心是卑斯省唯一的一個癌症中心，而朴教授是裡面專門做口腔癌及癌前病變研究的專家，同時她也是口腔病理專科醫師是溫哥華綜合醫院(VGH)口腔醫學病理科的主任(Oral Pathology & Oral Medicine, OPOM, program director)。我跟隨朴教授在臨床看診了解看診方式與 VELscope 與甲基藍的使用情況，以及後續的治療，還有學習並實際操作螢光毛細管電泳法(fluorescent capillary electrophoresis, FCE)來偵測分析病人檢體的 3p、9p、17p 的基因座缺失(LOH)的實驗。

四、 未來合作方向--小毛刷與細胞核型態分析 cytology-Nuclear phenotype Score

另外朴教授的研究團隊目前最新的正在的研究主題是使用小毛刷來採檢口腔病變的細胞，之後做成薄片再進行細胞核染色，經由高解析度光學顯微鏡做定量細胞學檢測分析它們的細胞核套數(ploidy)和 110 種細胞核型態(Nuclear morphology features)，目前透過 AI (Artificial Intelligence)系統已經能夠準確區分出高度上皮變異(high grade dysplasia)和發炎或受傷引起的病灶(benign reactive lesion)[6]，此技術搭配自體螢光設備(VELscope)一起使用來做口腔癌篩檢，預期可大幅增加口腔癌前病變篩檢的特異度(specificity)，此外收集了足量的樣本後也可以進一步分析染色體套數(ploidy)/細胞核型態(Nuclear morphology features)與各種癌前病變治療方式(光動力/冷凍治療)的效果之間的關聯性，朴芳瑀教授很希望能和我們合作這一塊，我也很渴望能夠加入朴醫師的團隊一起建立好這一套系統，日後可在臺灣推廣。

透過這次訪問學習交流，可以了解到口腔癌與癌前病變在卑斯省癌症中心有那些研究主題正在進行，希望可以擷取他國的長處，也方便之後建立起長遠的合作關係。

貳、 過程

一、 研究內容

i. 3p、9p、17p 基因座缺失(Loss of heterozygosity, LOH)

在過去是分析基因座缺失(LOH)是使用 radioisotope 需要電泳跑膠，耗時耗錢而且有相當的危險性。這幾年已經改成使用螢光毛細管電泳法(fluorescent capillary electrophoresis, FCE)，他不僅僅可以克服前述 radioisotope 的缺點，還能夠提供更多的資訊分析一些之前不能夠分析的 data，以下將會一一細述。

① Micro-dissection 病理標本解剖—收集上皮當疾病組、結締組織當對照組

福馬林固定蠟塊包埋的病理檢體被做成 10um 厚度的切片，首先是在顯微鏡下面完成 micro-dissection 取我們所要的口腔上皮組織當作實驗組，而下方的結締組織當作對照組，與我在碩士班研究造釉細胞瘤時的做 macro-dissection 的方法類似，只差在該實驗室是用 20 gauge 的針頭在做事情可以比較精細，我過去用的是刀片，且他們會使用酒精把玻片上標本浸濕這樣在刮檢體時才不會亂彈。我在朴教授碩士班學生 James Jeon 的協助下也自己用該實驗室習慣的方法做了一個 sample 的 micro-dissection。接



作者在 BCCRC 於解剖顯微鏡下實際操作 micro-dissection，右下圖為顯微性下分離之後的上皮。

下來在朴教授的實驗室有一位專業助理 Sarah Zhu 會完成抽 DNA 的工作。

② 專用於口腔癌基因座缺失(LOH)分析的螢光 DNA 引子(Primer)設計

再來是 primer 的設計，針對 9 個基因:9p171, 9 p1748, 9p1751, IFNA, 3 p1300 sh, 3 p1234, 3 p1228, 17 p786, CHNRB1 個別設計了專屬的 DNA 引子(primer)，其目標基因也就是 PCR 的產物為遍布在 genome 當中的微衛星(microsatellite DNA)也可稱為短串聯重複序列 (short tandem repeats, STRs)，之後的步驟同一般大家所熟知的聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)，但須注意兩點: 第一、PCR 的產物需要設計在 100-200 base pair 不能太長，畢竟有福馬林固定過的檢體抽出來的 DNA 會是碎裂的，第二、這個基因座缺失的判定需要比較正常和病變的組織特定 DNA 產物在兩個對偶基因(allele)的 peak area 比值，所以要先定量 DNA，確保每個檢體的 DNA 的濃度和體積都是一樣的，後續 PCR 的溫度設定也都一樣，這樣才能讓之後的比較有意義。

最後就是稀釋所有 PCR 的產物分別稀釋為 1:20 和 1:40 兩種濃度，分兩種濃度是為了減少因為訊號過強或過弱不能而分析的機率，然後送入 FCE 機器當中做分析。FCE 比較有趣的地方是我們會用不同的螢光(藍,綠,黃)標記上述九種引子的顏色，然後再跑 PCR 時就可以把不同顏色的兩、三種引子放在同一個管子內一起跑(如表一)，藉由不同顏色 GeneMapper6 軟體在分析結果時可將他們分開不會搞混，這樣可以節省時間和成本，不過這種多重 DNA 引子(primer)一起跑的 PCR 要注意會不會形成引子雙體(primer dimer)，朴醫師的團隊也是經過測試才找到適當 DNA 引子(primer)。

Primer Mix (Forward and reverse)
1. 9p1748 藍色 + CPT2 (124)黃色
2. 9p1751 藍色+ CPT2 (190)黃色
3. 9p171 綠色+ IFNA + CPT2 (169)黃色
4. 3p1228 藍色+ CPT2 (89) 黃色
5. 3p1234 綠色+ 3p1300sh 藍色 + CPT2 (124)黃色
6. 17p786 綠色+ CHNRB1 藍色+ CPT2 (169)黃色

表一 卑斯省癌症中心(BCCRC)分析口腔癌高風險分子株之基因座缺失 LOH 的 Primer 設計為此表的六組

③ 判讀有無基因座缺失 LOH



朴芳瑀教授實驗室的舊型FCE機器與內部結構

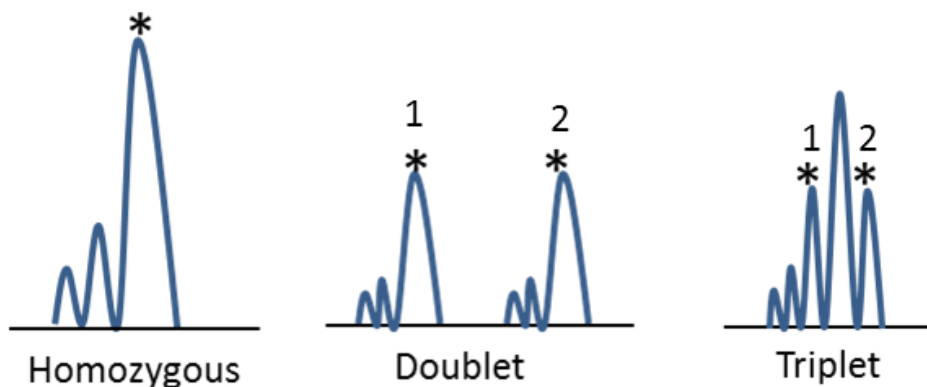
FCE 判斷有無基因座缺失 LOH 的原理也很容易理解，兩個 allele 的短串聯重複序列(STR) 會因為重複次數不同而有不同的分子量，在電泳時會分開，理論上正常組織兩個 allele 的訊號強度要一樣(如圖一中的 Doublet)，如果有疾病組有基因座缺失 LOH，那麼他的其中一個訊號勢必會變弱，透過下面的公式(Eq.1)可以計算正常組織和腫瘤組織的比值，朴醫師的團隊把 FCE 的結果跟十幾年前所用的 radioisotope 電泳跑膠的結果相比，定了 65% LOH 作為有無基因座缺失 LOH 的界定標準(cut-off)值。

$$\% LOH = \left| 1 - \frac{C_1 \times D_2}{C_2 \times D_1} \right| \times 100\% \quad (\text{Eq. 1})$$

C1 為對照組的第一個訊號; C2 為對照組的第二個訊號

D1 為疾病組的第一個訊號; D2 為疾病組的第二個訊號

大部分的檢體 FCE result 都是 Doublet，少部分是 Triplet 或 Homozygous，Triplet 的中間最高的 peak 是不採計的，要被判讀的是左右兩邊的 peak;而 Homozygous 的分析會在下一小段說明。(如圖一)



*為要判讀的目標訊號

圖一

④ FCE 的優勢-解碼同型合子(homozygous)

在過去使用 radioisotope 電泳跑膠的時代，當 DNA 的兩個對偶基因(allele)的短串聯重複序列 (short tandem repeats, STRs) 分子量相同時我們會無法辨別它是否有基因座缺失(LOH)，因為無論是正常還是病變的檢體跑膠都只會出現一條 band，這個結果在過去稱之為 noninformative 也就是無法提供有無 LOH 的訊息。但有了 FCE 之後雖然只有一個 peak area(圖一中的 Homozygous)我們卻可以靠比較訊號的強度，也就是 peak area 的大小來得知有無基因座缺失，這邊朴教授的團隊選擇了 **carnitine palmitoyltransferase2 (CPT2)**，它是一個坐落在染色體 1 p32.3 的基因，在頭頸癌和口腔癌這是個相對穩定的位置適合用來當作對照組基因(control gene)。如果目標基因的 peak area 的大小相較於 CPT2 少掉 50%就被歸類為是基因座缺失(LOH)也就是半合子 hemizygous。在表一中六組 PCR primer，每一組都有一個 CPT2，只要遇到 Homozygous 的情況 CPT2 就會派上用場。我在 BCCRC 實際操作來自兩個病人的四個檢體:195C、195D、196C、196D，實驗的結果代表如附錄。

總結:

這種用 PCR 螢光毛細電泳分析 LOH 的方式這幾年已經慢慢普及，各中癌症都有在分析 LOH，但在口腔癌的研究領域最早使用 LOH 來預測癌前病變惡性轉變率的部分，卑斯省癌症中心算是最先做大規模分析的團隊，口腔癌 3p、9p、17p 基因座缺失就是由朴醫師所屬的團隊所研究出來。在加拿大朴醫師是目前口腔癌研究的權威，我很榮幸能夠直接到當地跟她本人及她的團隊學習討論最新的技術，也了解分析基因座缺失(LOH)的技術的演變的過程。

原本我出國前有計畫要探討嚼食檳榔的口腔癌患者之基因座缺失(LOH)是否會有不同，來了溫哥華後才知道朴教授的研究團隊已經分析過這一塊了，因為溫哥華其實有大量的華人和臺灣人，在他們未發表的統計結果顯示檳榔或抽菸或人種都不會影響口腔癌基因做缺失的種類，也因此 9p171, 9 p1748, 9p1751, IFNA, 3 p1300 sh, 3 p1234, 3 p1228, 17 p786, CHNRB1 這九個位點應該可以直接應用在臺灣的病人身上。

ii. 使用高解析度光學顯微鏡做定量細胞學檢測 Quantitative cytology using

High-resolution microscopy-cNPS(cytology-Nuclear phenotype Score)→已證實可精準偵測高度上皮變異; 期盼未來能找出它和光動力或冷凍治療之效果的關聯性

此概念類似子宮頸抹片，用小毛刷來取樣口內癌前病變或癌症，做成薄片然後進而分析，高解析度光學顯微鏡(圖二)做定量細胞學檢測分析的項目包含兩項(1) DNA 含量套數(ploidy) (2) 細胞和型態(Nuclear morphology features)大約 110 種細項。

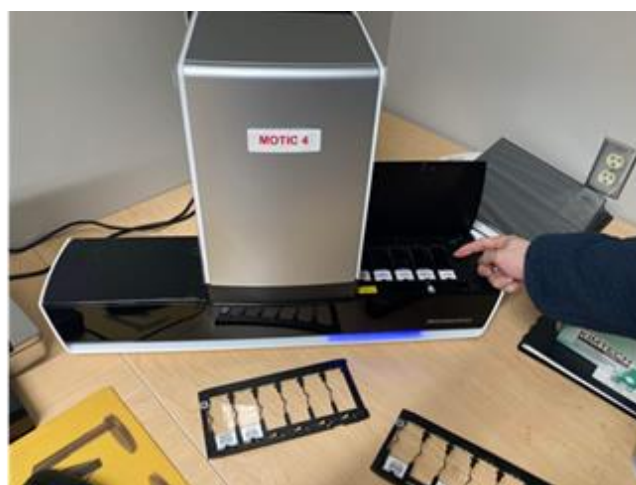
小毛刷在病人口內採檢時正面和背面各刷十下，完成採檢後會先在第一管 cell lysis solution 浸泡一下(幾秒鐘)，然後折斷毛刷頭放在第二管 cell solution 中保存，第一管主要是將蛋白質溶解日後可用來抽 DNA/RNA，第二管才是收集細胞做成細胞薄片(Thin layer Cytology slides)，

細胞薄片的製作的過程我也參與了一次，首先在解剖顯微鏡下初步評估細胞數，然後再依照經驗決定要取多少量的 cell solution 來離心收集 cell pellet 做成薄片，其目標是每一張玻片上的細胞核可以有 400 個，而且彼此之間最好不重疊，如此一來 AI 在分析才會達到最好效果。接著是細胞核 FT(Feulgen-Thionin)染色*，此步驟需要 8 小時，完成後蓋上蓋玻片。風乾至隔天就可送入機器中進行後續分析(圖二、圖三)。

*FT(Feulgen-Thionin)為專有名詞

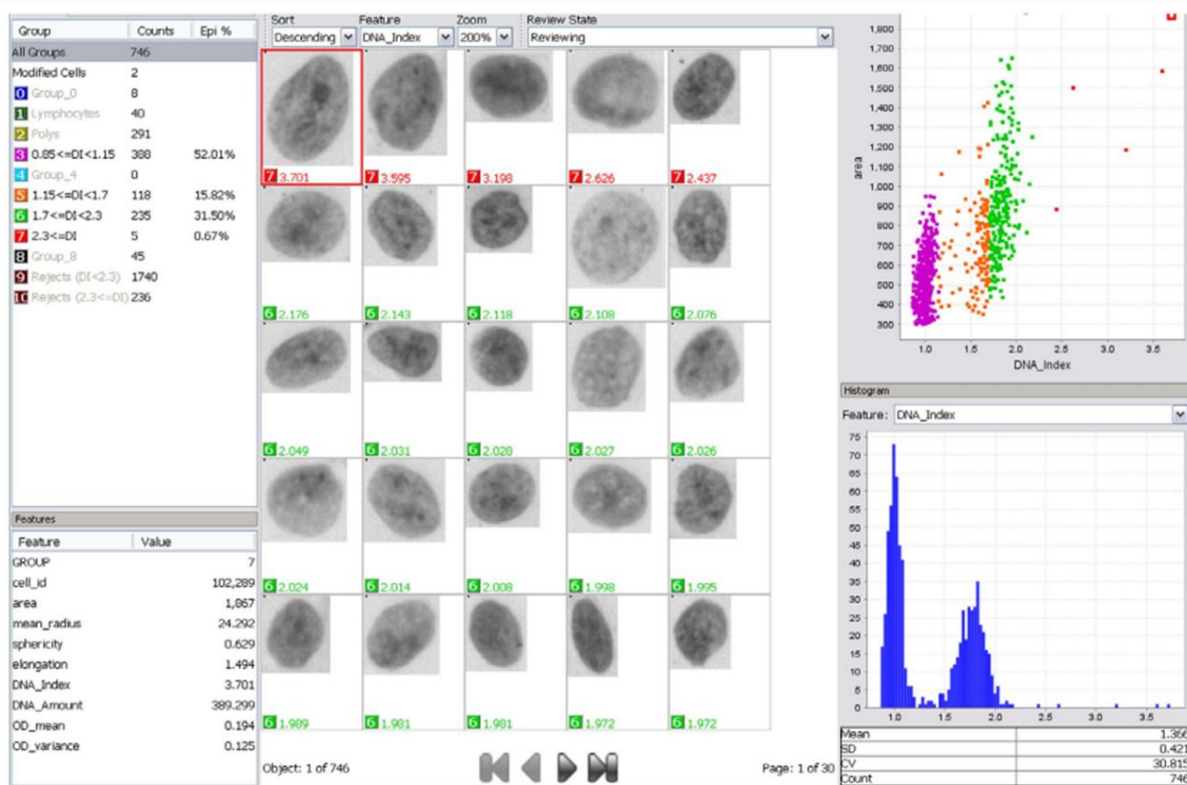
- i. 用 DNA 影像細胞術(DNA-image cytometry)來偵測 DNA 含量套數(ploidy) ，結果如圖三中的 DNA index 。DNA index(DI)可以照數值分成以下四個族群(group):
 - ✓ Group 3=diploid(DI: 0.85-1.15)
 - ✓ Group 5=hyperdiploid(DI: 1.15-1.7)
 - ✓ Group 6=tetraploid(DI: 1.7-2.3)
 - ✓ Group 7=aneuploid(DI: >2.3)
- ii. 細胞和型態(Nuclear morphology features)大約 110 種細項，這個部分是仰賴 AI 軟體去分析。如圖三中間是細胞核的各種型態。

ClearCyte®軟體可以綜合以上兩項分析，朴醫師的研究團隊在 2020 年發表在 Journal of Oral Pathology & Medicine 的論文顯示經過重新訓練和改良的 iClearCyte®軟體在偵測高度上皮變異有更良好的表現，其 sensitivity, specificity, PPV, 和 NPV 分別為 100.0%, 86.7%, 89.7%, and 100.0%。而目前朴教授正在收案分析的部分是希望透過 iClearCyte®軟體分析出對光動力或冷凍治療會有顯著反應的細胞核特色，目前光動力與冷凍治療的抉擇是按照醫師經驗，通常偏紅色的或疣狀的癌前病變選擇光動力治療，角質較厚的白色病變則選擇冷凍，如果能夠透過這套 AI 系統找出對光動力或冷凍治療分別會有效果的細胞核特色，將可以給新上路還沒有很多經驗的醫師很好的指引。



圖二 卑斯省癌症中心最新的高解析度光學顯微鏡，將有細胞核染色片子放入之後就可以透過

軟體獲得 DNA 含量套數(ploidy)和，細胞和型態(Nuclear morphology features)



圖三 DNA 影像細胞術(DNA-image cytometry)，可同時分析染色體套數(DNA index)和 110 種細胞核型態。(此圖節錄自 Parfenova, E., et al. J Oral Pathol Med, 2021. 50(5): p. 502-509.)

iii. 未來展望-早期抓出隱藏性淋巴結轉移(occult lymph node metastasis): 透過 DNA-image cytometry 篩選出容易轉移到頸部淋巴結的高風險細胞核套數/型態

口腔癌平均的五年存活率 30-60%，而影響預後的一個重大因素是有無頸部淋巴轉移，一旦出現頸部淋巴轉移病人的存活率將下降一半。按照卑斯省癌症中心的統計，一開臨床檢查是沒有淋巴轉移(cLNO)的口腔癌病人有 25%最後會被發現有淋巴轉移[7]，也就是說如果每個病人都做頸部淋巴廓清將有 75%的病人是被多做的。但如果選擇都不做那麼將有 25%的病人錯失了早期處理掉 occult lymph node metastasis 的機會進而影響之後的存活率。依照臺灣國衛院訂的指引(guideline)，第一期的口腔癌是可選擇做頸部淋巴廓清+切腫瘤或只切腫瘤不做頸部淋巴廓清，第二期以上的口腔癌則是都建議在切腫瘤時一併做頸部淋巴廓清，溫哥華綜合醫院則是第一期和第二期口腔癌都由醫師自己決定要不要做頸部淋巴廓清。按照過去的文獻目前大相信頸部淋巴轉移和侵略深度(depth of invasion)以及癌細胞的分化不良(poorly differentiated)有相關，朴教授的研究團隊則是發現和 5mm 為界的侵略深度(depth of invasion, DOI cut-off: 5mm)無關但是癌細胞的分化不良(poorly differentiated)有顯著相關。

然而到底有沒有機會靠著初次診斷口腔癌時的腫瘤病理標本，找出頸部淋巴結轉移有高度相關，敏感度和特異度都很好的分子生物學/細胞核特徵是朴教授的研究團隊這幾年正在探討

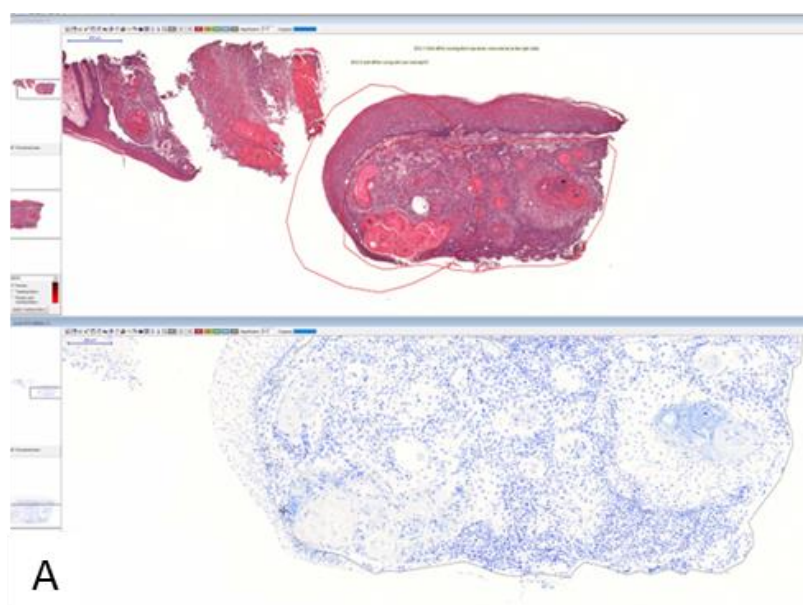
的。朴教授的博士班研究生 Kelly Liu 在 2020 年所發表在 *Oncotarget* 的論文提出了 4-micro RNA panel (miR-21-5p, miR-107, miR-1247-3p, and miR-181b-3p) 可以準確地預測頸部淋巴結的轉移 [8]。

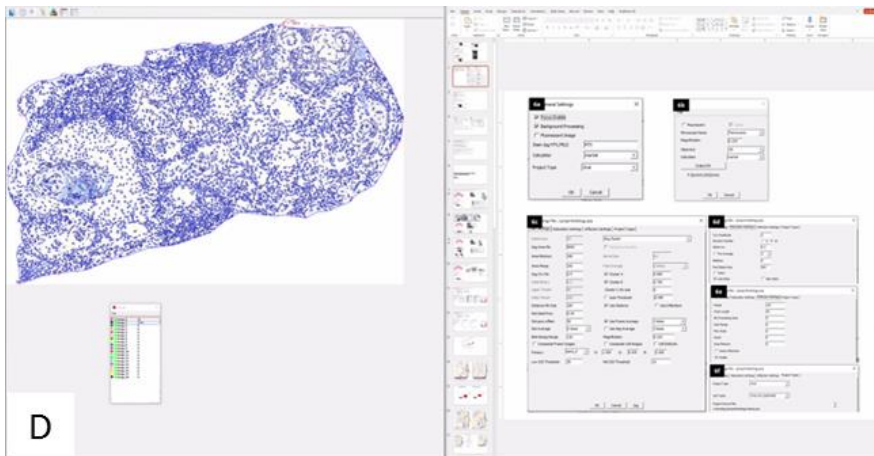
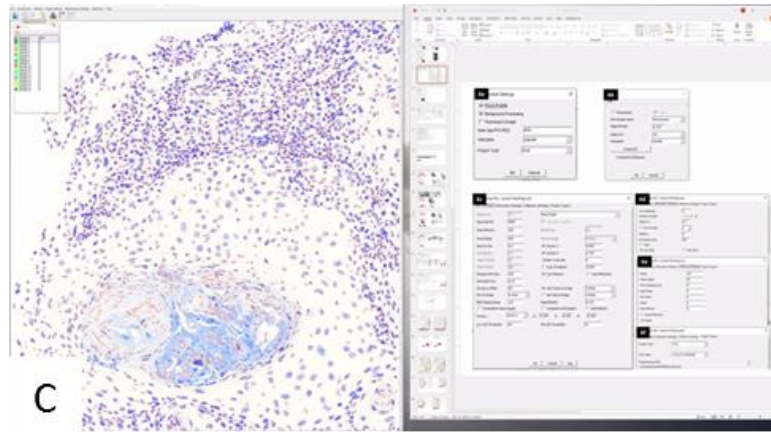
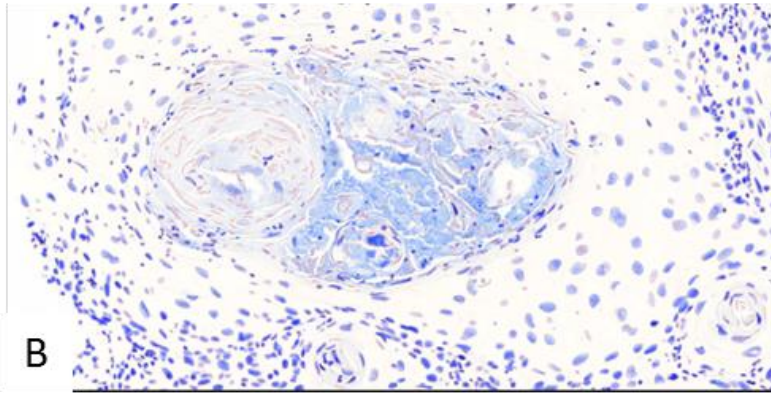
目前正在進行的實驗是病理切片的細胞核染色 FT(Feulgen-Thionin) staining 分析，期望藉此做出一套 AI 軟體可以靠分析細胞核型態篩選出會轉移到頸部淋巴結的細胞核特色。希望之後可以透過更簡單快速的方式給我們臨床外科醫師要不要做頸部淋巴廓清很好的指引。

流程如圖四所示：

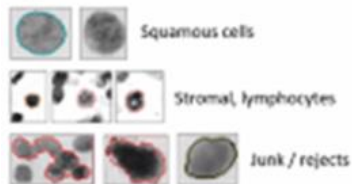
- A: 使用 FT(Feulgen-Thionin)*細胞核染色，對照著同一個組織蠟塊的 HE staining 的影像把腫瘤的部分圈出。
- B: 使用 Histology II 的軟體做 segmentation 紅色虛線是軟體選出的細胞核。
- C: 人工調整軟體細部參數使 segmentation 看起來更完善。
- D: 完成 segmentation，把影像轉換成細胞核影像。
- E: 軟體可以進一步做細胞分類 cell classification: 包含淋巴球，纖維母細胞，鱗狀上皮細胞，以及其他(如重疊的細胞)。最後只挑出鱗狀上皮細胞，再去使用 AI 作分析，可以比較有淋巴轉移和沒有淋巴轉移的鱗狀上皮細胞核差異。

圖四

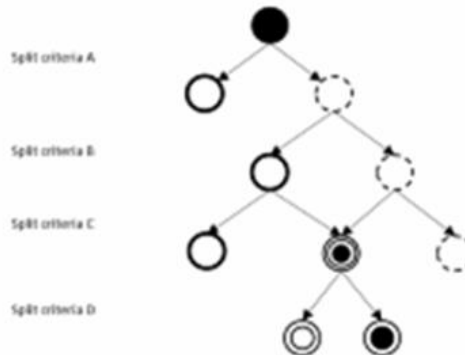




Segmentation for each ROI



Cell classification tree



LEGEND	
●	All segmented objects (~8000 to 15,000 per ROI)
○	Good epithelial squamous objects
◐	Good non-squamous objects
◑	Good non-squamous objects (lymphocytes)
◒	Good non-squamous objects (endothelial, dendritic, macrophage, others)
○	Rejects / Junk

圖四

E

二、 臨床工作

朴芳瑀醫師星期一在卑斯省癌症治療中心(BC Cancer Agency)、星期五在溫哥華綜合醫院(Vancouver general hospital, VGH) 各有一整天的門診。朴醫師的門診主要在看口腔癌前病變，不同於 15 年前的請病人戒除菸、酒、檳榔等不良嗜好，然後 wait- and – see 的舊觀念，現在普遍認為要採取積極治療的策略，畢竟這些癌前病變最終有 11% to 36% 會惡性轉變，其惡性轉變平均所需的時間為 33.6 個月(0.5-16 年)。在臺大醫院現在對癌前病變的治療想法其實也是如此，朴醫師的治療方式為手術，光動力治療，冷凍治療。跟臺大醫院口腔外科很類似但有些細節的差異和演進是我這次國後才曉得的，以下分別介紹。

i. 看診方式及手術→每次都拍照記錄口內病變，在電腦螢幕上做比較；使用甲基藍和自體螢光設備(VELscope)；自己做手術和處理檢體

朴醫師門診大約 15-30 分鐘約一個病人，從早上八點看到下午三點，這樣一天大約可以看完 16-18 個病人。每個病人除了一般白光下的檢察外一定還會使用甲基藍和自體螢光設備(VELscope)，且這三種檢查都會用單眼數位相機拍照記錄，每位病人都有自己的資料夾儲存每次看診的照片，病人來之前除了看過病歷同時必定會開啟之前的照片和這次做精準對照，有照片也方便跟病人講解口內病變的變化。

需要做切片的病人幾乎都是當場自己在門診做，可說是十分有效率。做完之後朴醫師常常會自己處理檢體，然後自己看片子。醫師自己做手術自己看病理玻片的好處是可以把病理和臨床發現做很好的連結。增加醫師臨床判斷的準確度。我在病理科跟朴教授一起看病理玻片時她可以很明確地把臨床發現和病理組織做對應。來這邊讓我見識到一條龍的作業模式加上實事求是的態度。



攝於加拿大溫哥華綜合醫院-口腔癌前病變門診

ii. 自體螢光設備(VELscope)-正常組織呈現綠色自體螢光；異常組織呈現黑色，顏色對比容易區分

VELscope 是卑斯省癌症中心口腔癌研究團隊結合加拿大英屬哥倫比亞大學(UBC)的物理學家所研發的裝置，他會發出藍紫色的光(400-460 nm)，而正常的組織被照射後會產生綠色的自體螢光(autofluorescence)透過一個只能讓綠光和紅光透過的濾鏡，可被檢查者看見。而組織失去自體螢光(autofluorescence)則和上皮變異或下方結締組織基質(connective tissue stroma)的改變相關，透過 VELscope 觀察這些異常組織呈現黑色。這些細部的機轉可歸類為以下幾項: 1.

上皮變厚 2.上皮細胞細胞核改變早成細胞核散射 3.上皮細胞的 NADH 和 FAD 代謝方式改變 4.結締組織的膠原帶白分解 5.結締組織的微血管增加。這些失去自體螢光的組織呈現黑色，和綠色呈現強烈對比。(如圖五)

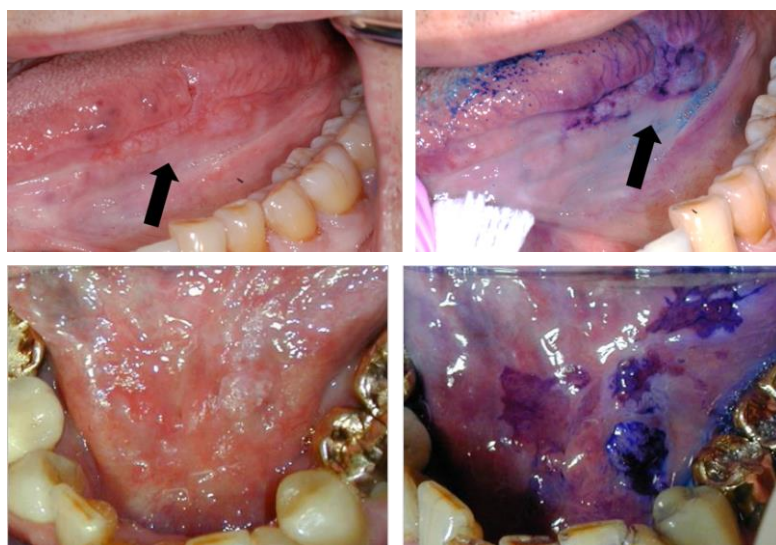


圖五

此圖顯示病患左側夾黏膜有中度上皮變異，圖左是作者在開刀房使用 VELscope 來偵測病灶 margin，正常組織為綠色，異常組織為黑色；圖右可見此病灶再一般白光下大部分呈現紅色，與正常口腔黏膜十分相近不容易區分。(2021 年攝於臺大醫院口腔外科)

iii. 甲基藍染色(Toluidine Blue Staining)可找出高風險的口腔癌前病變—精準引導切片位置

卑斯省癌症中心 Dr. Lewei Zhang 在 2005 年所發表的論指出:”甲基藍檢測陽性的癌前病變相較於陰性的癌前病變有顯著較高的惡性轉變率(大於 6 倍)”[9]。目前在臺大醫院口腔外科並沒有使用甲基藍，就我的了解全臺灣也幾乎沒有人使用在口內病變，大家的質疑是口腔癌或高度上皮變異用眼睛看就好了，為何還需要多此一舉。為什麼要使用甲基藍?這邊有幾個我原因必須提出來講: 第一、口腔病變範圍常常不小，一個病灶常包含了輕度到重度的上皮變異，我們都知道做切片取樣時一定要切在最嚴重的位置已面漏掉重要的原位癌或癌症診斷，甲基藍的染色可以標記出最高風險/高度上皮變異的位置，明確的讓醫師知道切片該切在哪裡，避免錯失正確診斷。第二、凡高度以上的黏膜上皮變異常常都帶紅色，如此一來就與粉紅色的黏膜難以區分，自體螢光設備(Velscope)固然可幫助我們決定病變邊界，但自體螢光設備(Velscope)一臺六萬臺幣花費較高，而且需要時間學習判讀影像，甲基藍的染色便宜容易快速，對外科醫師來說開刀的時候最重要的要徹底清除高度上皮變異與



圖六 朴芳瑀教授提供的臨床照片: 舌頭和口底的高度上皮變異(左)與使用甲基藍之後的情況(右)

癌症，多花幾秒鐘的時間使用甲基藍必定能夠大大減少腫瘤被殘存在口腔內的機率。朴醫師所提供的這兩個臨床案例照片是以上兩點很好的證明(圖六)。

iv. 光動力治療(Photodynamic therapy, PDT)—重新設計過適合口腔病灶的發光二極體 LED 裝置取代臺大口腔外科現有的雷射

光動力治療(PDT)研發拿來治療腫瘤最早是在 1970 年代用在膀胱癌和皮膚癌，在 1993 年之後光動力治療(PDT)開始被美國食品藥物管理局(FDA)核可應用在各種表淺的癌症(superficially invasive carcinoma)或癌前病變上。它的背景原理和發展史在 R Saini & CF Poh 2012 年所發表在期刊 Oral Diseases 的文獻綜述中有詳細的說明[10]。

光動力所使用的局部塗抹藥物為血紅素 heme 的前驅物”五胺基酮戊酸 5-Aminolevulinic acid (ALA)”，在細胞內可被代謝成感光的物質 photosensitizer (PS),也就是 ALA-induced PpIX，之後給予特定能量的光，細胞內的氧會經由光化學反應而變成含氧自由基 reactive oxygen species(ROS)導致目標細胞的死亡。因為分裂快速的細胞其細胞內的鐵離子和鐵附加酵素(ferrochelatase)都比較低，所以可以大量累積 PpIX(PS)。因此一般相信光動力治療對於分裂快速的細胞(例如: dysplasia cell)是有專一性的，對分裂慢的正常細胞影響會比較小。

光動力治療被拿來治療口腔癌前病變在臺大醫院口腔外科已經有十幾年的歷史，臺大所使用的光源為雷射，朴芳瑀教授所使用的則是發光二極管 LED，表二為雷射和 LED 的比較。朴醫師特別請廠商設計了他想要的藍光 LED(圖七)，雖然波長無法像 laser 那麼精準但透過濾片還是可以控制在一定範圍之內，有了波長範圍廠商就可以算光的總能量，每個位置照 9 分鐘所得到的總能量足夠產生效果。比起雷射的點狀光源，LED 的光源探頭長寬有一公分多，很適合用在口內大範圍的病灶。值得注意的是它的光源是陷入外殼之中，所以當探頭貼在口內病灶上照光時，光不會散出去，可以避免傷及無辜的正常細胞。

	雷射 Laser	發光二極管 LED
費用	昂貴 (美金\$10 000–30 000) 需要特殊保養	較便宜(低於美金 5000) 維持容易
光的波長	有特定精準的波長	能控制在一定範圍
能否靠內視鏡傳遞	可，能透過光纖用在內臟: 膀胱、腸胃道、肺的小病灶	否
照明的範圍	~0.5–1 mm ²	~5–20 cm ²
計算的光的總能量	因為波長固定所以較容易	較難

表二 雷射(laser) 和 發光二極體(light-emitting diode, LED)之比較，整理自 Saini R, Poh CF. Photodynamic therapy: a review and its prospective role in the management of oral potentially malignant disorders. Oral Dis. 2013 Jul;19(5):440-51.



圖七 朴芳瑀醫師所使用的光動力治療(PDT)工具 LED，圖左為機器圖中為導線，圖右是會發出藍光的探頭，它的光源設計是凹陷於外殼中的。

v. 冷凍治療(Cryotherapy)

這邊的冷凍治療使用的工具跟臺灣是一模一樣液態氮瓶，口腔癌前病變只侷限在上皮，我過去所知是一個位置每次噴 10 秒鐘噴三次就可以把上皮凍死，如果治療時間不夠長，剩餘的上皮變異細胞得到發炎介質和傷口的生長因子，很快又會再冒出來，如果治療時間太長直接則傷及無辜，而且延長傷口癒合時間。我向朴醫師請教了她的治療經驗，她表示口腔每個部位溫度不一樣，比如說舌頭的血液循環比較好溫度較高，冷凍治療需要的時間就會比較長，所以我們不能一味遵照 10 秒鐘噴三次的原則。朴教授的經驗是，液態氮噴完之後會有白色的硬塊，如果不管在哪個部位這個硬塊可以在持續 15-20 秒不融化，這大部分就會有不錯的結果，如果一次不行 3-4 周之後再治療第二次就會成功。

在使用冷凍或光動力治療處理癌前病變時，需要密切觀察病灶的臨床變化，發現效果不好時還是需要手術切除，另外朴醫師特別提到是有三種 clinical high risk 的病變要特別注意，第一是 size>3cm，第二是長在舌頭上的病變，第三則是斑點狀白斑(speckled leukoplakia)。以上這三種病變在治療前就要跟病人說明風險，如果治療了一兩次方現狀況不對要趕快停止轉給外科醫師藉由手術移除病灶較為安全。

vi. 未來展望-在臺灣成立癌前病變門診(dysplasia clinic)

朴芳瑀教授表示預計今年要回再次臺灣當訪問學者，這次會停留三個月的時間，朴醫師想要仿照在溫哥華綜合醫院的癌前病變門診(dysplasia clinic)看診形式在臺大總院或分院也成立一個屬於臺灣的口腔癌前病變門診(dysplasia clinic)，把前述她在加拿大所建立的這一套看診作業流程及治療方式帶回臺灣，造福臺灣的病友。

三、 病理學科

口腔病理科辦公室在溫哥華綜合醫院二樓，開刀房則是在三樓檢體可以從氣柱直接送達二樓病理部進行後續標本處理。病理標本的製作過程會與臺灣類似會量測檢體大小，塗上不同顏色的顏料標記不同方向邊界，處理檢體的醫師或技術員會戴著耳機跟麥克風，作檢體的過程會唸出來聲音傳遞到書記員那邊，書記負責把這些檢體的描述打字成為病理報告的一部份，處理檢體的人不需要脫手套寫字之後再自己打字，這間醫院的方法可以節省許多時間，增加處理事情的效率值得學習。

我參與了口腔病理科的線上會議以及口腔病理科住院醫師一起看病理玻片的教學活動。因為我在臺大臨床牙醫所的碩士班是口腔外科李正喆醫師和口腔病理科張玉芳老師的共同指導，我在碩士班時常常跟張玉芳老師一起看片子奠下了一些基礎，與朴芳瑀醫師和她的口病科住院醫師們一起看片子並沒有太大的障礙。讓人印象深刻的事情是對於 glandular odontogenic cyst(GOC)這個比較新的診斷朴教授獨到的見解，GOC 不同於其他的 odontogenic cyst 它復發機率高(21% - 55%)，所以很需要鑑別診斷出來然後給予較侵略性的治療。在過去不能沒有 GOC 診斷的時候他常被當成 dentigerous cyst 或 lateral periodontal cyst。然而這個新的診斷的病理型態千變萬化增加鑑別診斷的挑戰性。目前比較多人採用的是 Fowler et al.在 2011 年在整理了 46 個 GOC 之後所提出的 7/10 法則，也就是下圖的 10 個常見的病理特徵要滿足七個以上。針對 GOC 朴教授有自己的想法，按照她的觀察找到了三種特色，滿足這三種特色的一定是 GOC: 1. 有一些柵狀排列的基底細胞(basal cell)、2 囊腫壁有局部較厚的上皮內涵 intermediate cell、3. 上皮的最表面會有立方細胞(superficial low cuboidal cells)。因為依據經驗所有影像學 multilocular radiolucent lesion 很肯定為 GOC 的 case 都會擁有這三個特色。對一個口外醫師來說跟病理學家看片子是件新鮮有趣的事情，自己找出新的疾病分類的診斷標準可是我從未想過的，優秀的病理學家一定都具備很好的觀察力歸納，來溫哥華綜合醫院看片子讓我更深入認識病理學和病理科醫師。

Microscopic parameters in glandular odontogenic cyst

Parameter	No. & % of cases (N = 46)
Eosinophilic cuboidal cells	46 (100%)
Microcysts	44 (95.7%)
Apocrine snouting	42 (91.3%)
Clear (vacuolated) cells	41 (89.1%)
Variable thickness	41 (89.1%)
Tufting (papillary projections)	39 (84.8%)
Mucous cells	33 (71.7%)
Epithelial spheres	31 (67.4%)
Multiple compartments	29 (63.0%)
Cilia	10 (21.7%)

參、心得

一、緣起-美國口腔病理學會年會 Academy of Oral and Maxillofacial Pathology (AAOMP)

我目前是口腔顎面外科的第五年住院醫師，朴芳瑀教授是比我大 26 歲的臺大牙醫系學姊，而我認識朴芳瑀教授要從五年前說起，我當時是臺大臨床牙醫所碩士班口腔外科組的學生，我跟隨臺大口腔病理科張玉芳老師做造釉細胞瘤相關的分子生物學研究，分析出臺灣本土造釉細胞瘤基因突變的情況，張玉芳老師是臺灣唯一有美國口腔病理專科醫師執照的牙醫師，也曾經在美國華盛頓大學口腔病理學科任教兩年，我很幸運地跟到張玉芳老師讓我有機會出國見識，第一次參加美國口病學會年會是在美國羅德島州，在那時候朴芳瑀教授就已經是加拿大口腔病理學界的權威，在五年前朴教授私下口頭跟我介紹了 Velscope 建議我們外科醫師使用，我對此十分好奇，回國後查一些相關資料，從之後我每年都去參加美國口病學會年會貼海報連續參加了四年，我每年都有機會跟朴醫師討論我的研究成果和口腔癌相關的議題，我們也因此結下了情誼。



2019年美國口腔病理學會年會AAOMP(攝於美國邁阿密): 圖左，作者與朴芳瑀教授宣傳2022世界口病學會在臺灣；圖中，作者與朴芳瑀教授合影；圖右，作者與張玉芳老師合影

二、交流--如何想出有想有有影響力的研究主題

三年前朴芳瑀教授回臺大醫院當訪問學者兩星期，朴醫師幫我們上了 10 堂課，跟我們分享了 Velscope 的使用和她當時正在做的口腔癌及癌前病變相關的研究，我那時很驚訝地發現原來口腔癌原來還可以有這麼多研究主題，這次來到卑斯省癌症中心讓我更深入的了解這些研究的細節與實際操作情形。

跟朴醫師相處的過程我感受到她的聰明獨立大膽，學姊博學之外很有自己的想法，她這些研究的點子其實都是來自臨床的自細觀察與思考，以頸部淋巴結節轉移來舉例，學姐告訴我她在調醫院資料時候就發現了一些特殊現象，許多腫瘤雖然小但會轉移到頸部淋巴結，也有些腫瘤放再久長的再大還是不會轉移到頸部淋巴，因此她假想也許口腔癌腫瘤可以分成兩種:會轉移到淋巴跟不會轉移到淋巴，她想要找出分子生物學的 marker，挑出這些容易轉移的腫瘤作為我們是否該做頸部淋巴廓清的指引，畢竟早期清掉這些 clinical occult lymph node metastasis 很重

要，而我們也不想 over-treatment 造成不必要的傷害。學姊率先找出了會淋巴轉移的腫瘤其 microRNA 的特色投稿在國際期刊。再舉例，有些中度上皮變異放了十年還是中度上皮變異，也有病人就算已經戒除菸、酒之類的致癌物，中度上皮變異還是很快地進展癌症。有這樣了臨床發現，優秀的醫師科學家就會想到要去找出這些比較容易癌變的病灶其分子生物學上的特色，也的確找出了 3p、9p、17p 的基因座缺失(LOH)可以幫助預測低度上皮變異之後的癌變可能。

朴醫師是一位非常多產的醫師科學家，她所發表的論文都是一些對未來的臨床治療很有影響力的主題，我想學姐能走在口腔癌研究領域的最前端憑藉著敏銳的洞察力，和真心要為病人解決問題的熱誠。此外朴教授很會講學，十幾年來吸引了許多的學生去她實驗室當 volunteer，老師也很大方接受，也常常幫來過自己實驗室的學生寫推薦信，朴醫師在當地學界可說是名滿天下。

三、 自我省思與合作計畫

在臺大醫院口腔外科的生活是忙碌的，病人一個接著一個來，有時候門診一個早上要看完 70-100 個病人，刀房也是戰戰兢兢努力配合各個老師的開刀習慣。我們平日都熟讀教科書熟記 guideline 希望用力打好做臨床醫師的基礎，然而這次來到卑斯省的癌症中心讓我對臨床工作有了嶄新的看法。博學是為了了解現代醫學的框架，看病人時除了按照 guideline 處置，需常常問自己問題，要有跳脫框架的思考才能推動醫學進步。

我個人其實很看好細胞核 AI 分析來預測光動力冷凍治療效果以及淋巴轉移的機率這兩個研究的主題會有好結果，舉例來說紡錘狀上皮細胞癌 spindle cell carcinoma 它對放射線治療化學治療都有很高的抗性，也很容易會有遠轉移預後很差，這些是我們所熟知的。值得注意的是錘狀上皮細胞癌(SpCC)的細胞核型態也不同於一般的鱗狀上皮細胞癌，顯微鏡下觀察到的是細胞核常常是特別大，核仁很明顯，且正在分裂的比率很高。我相信光動力或冷凍治療有抗性的癌前病變它的細胞核也會有一些特色可以抓出來，特別是光動力治療是特別針對分裂快速的細胞才會比較有效，快速分裂必定會影響其細胞核型態和染色體套數。

容易淋巴轉移的腫瘤目前文獻顯示其病理組織型態常為分化不良(poorly-differentiated)，這樣細胞核特色顯微鏡下肉眼就可看出差異，如果用 AI 分析 110 種細胞核特徵要精準抓出容易淋巴轉移的腫瘤應該是指日可待，以後對於”臨床影像檢查沒有淋巴轉移(cLN0)的口腔癌病人要不要做頸部淋巴廓清”，可以提出很好的指引。臺灣有著非常多的口腔癌檢體，朴芳瑀教授想要跟我和口腔病理科張玉芳老師合作這一塊，這是我們的下一步計畫。

四、 未來展望-臺大口腔外科的研究主題—應用病理切片細胞核 AI 分析預測手術前之引導性化療(induction chemotherapy)效果

在和朴醫師聊天的過程她告訴我她所屬的在溫哥華綜合醫院口腔癌的病人是從來不做術

前引導性化學治療(induction chemotherapy)，都是直接開刀。早在幾十年前幾個大規模的隨機臨床試驗發現引導性化學治療對於長時間的存活率並沒有幫助，而且雖然腫瘤會縮小但原本的位置能有一些安靜的腫瘤幹細胞存在之後還是可以復發，所以應該要按照化療前的照片影像，依照原本腫瘤的大小再加安全距離去切除，另外是經過化療篩選後存活的癌細胞可能更壞更有侵略性，這是臺大的我們清楚明白的，所以在臺大也沒有每個口腔癌的病人都做術前引導性化學治療，目前引導性化學治療在臺大口腔外科的腳色是讓原本可能不能切除、離重要器官(如頸動脈)太近的巨大腫瘤變成可以安全移除，但這個背後的風險是:引導性化學治療的結果分成四種其中一種是 disease progression，也就是對化療反應不好越做越大，常見於錘狀上皮細胞癌(SpCC)，我想腫瘤也可分成對化療會有良好反應和不太會有反應兩種。腫瘤之間的這種差異很可能也可以藉由切片病理標本的細胞核 AI 分析找到答案。

五、 致謝

從六年前在念碩士班時，當時的口腔外科主任李正喆醫師指派我去口腔病理科跟張玉芳老師做研究開始，我就注定成為兩科之間連結的橋樑。特別感謝前牙醫專業學院院長江俊斌醫師在我當研究生和 PGY 的時候申請財團法人口腔疾病防治基金會的經費，贊助我去美國開會的機票錢，鼓勵我去國外見見世面。這次是章浩宏主任舉薦鼓勵我申請這個住院醫師短期出國訓練計畫，朴芳瑀教授得到我出國公文後認真地召開實驗室會議(lab meeting)，安排了她的助理與博士班和碩士班研究生帶著我參與各個研究的主題。我人還沒到加拿大東西都已經準備好在她實驗室等著我去做，下飛機後朴教授親自開車接我到飯店，回程也是朴醫師親自送我到機場，可以感受到朴教授對此次出國交流訪問的重視。

這個冬天六個星期在溫哥華，讓我第一次體驗到零下負 12 度的低溫。這段日子因為卑斯省疫情日漸嚴峻，我快離開時卑斯省每天新增四千個 Covid-19 的確診者，基於安全考量這次沒有去太多地方參觀，原本最後一星期有計畫要進開刀房看手術，也因疫情再起而沒有成行。很感謝朴教授在這個艱困的時刻願意收留包容我在她身邊跟診、一起閱覽病理玻片、進她的實驗室做實驗。在國內外都不平靜的時節，我很幸運的平安歸國沒有染疫而且滿載學問而歸。很希望回國後我可以很快幫忙朴教授實踐她的合作計畫和在臺灣成立癌前病變門診的心願。



2022 年一月作者拍攝於溫哥華

肆、建議事項:

- ✓ 在臺灣推廣 VELscope，將其使用方法與原理編為教材，納入牙醫系大學課程中。
- ✓ 於臺大醫院現在的癌篩中心口腔篩檢站增設一台 VELscope 和放置甲基藍→提升找出病灶的敏感度，如果發現可疑的癌前病變後使用甲基藍檢查又呈陽性反應，可以讓負責癌症篩檢醫師知道需要盡快安排回診切片。
- ✓ 歡迎並協助朴芳瑀教授回國當訪問學者三個月，並在臺大總院或分院成立口腔癌前病變門診(dysplasia clinic)專門處理腔癌前病變，此門診將包含前述的使用甲基藍和 VELscope 檢查，以及光動力治療和冷凍治療與正在進行的小毛刷細胞核型態分析研究。
- ✓ 邀請耳鼻喉科、家醫科、皮膚科醫師每年來口腔癌前病變門診(dysplasia clinic)外放見習參觀，促進科與科之間交流互動，共同為口腔癌前病變的檢查與治療和研究努力。
- ✓ 與朴芳瑀教授一同合作研究細胞學檢查之細胞核型態分析與光動力和冷凍治療效果之間的關聯性，在臺大醫院收案。
- ✓ 新增口腔癌前病變檢測 3p、9p、17p 基因座缺失(LOH)的選項給病患，幫助病人知道口內病灶的癌變風險。有更多的資訊可參考來引導病友選擇適合的治療計畫。

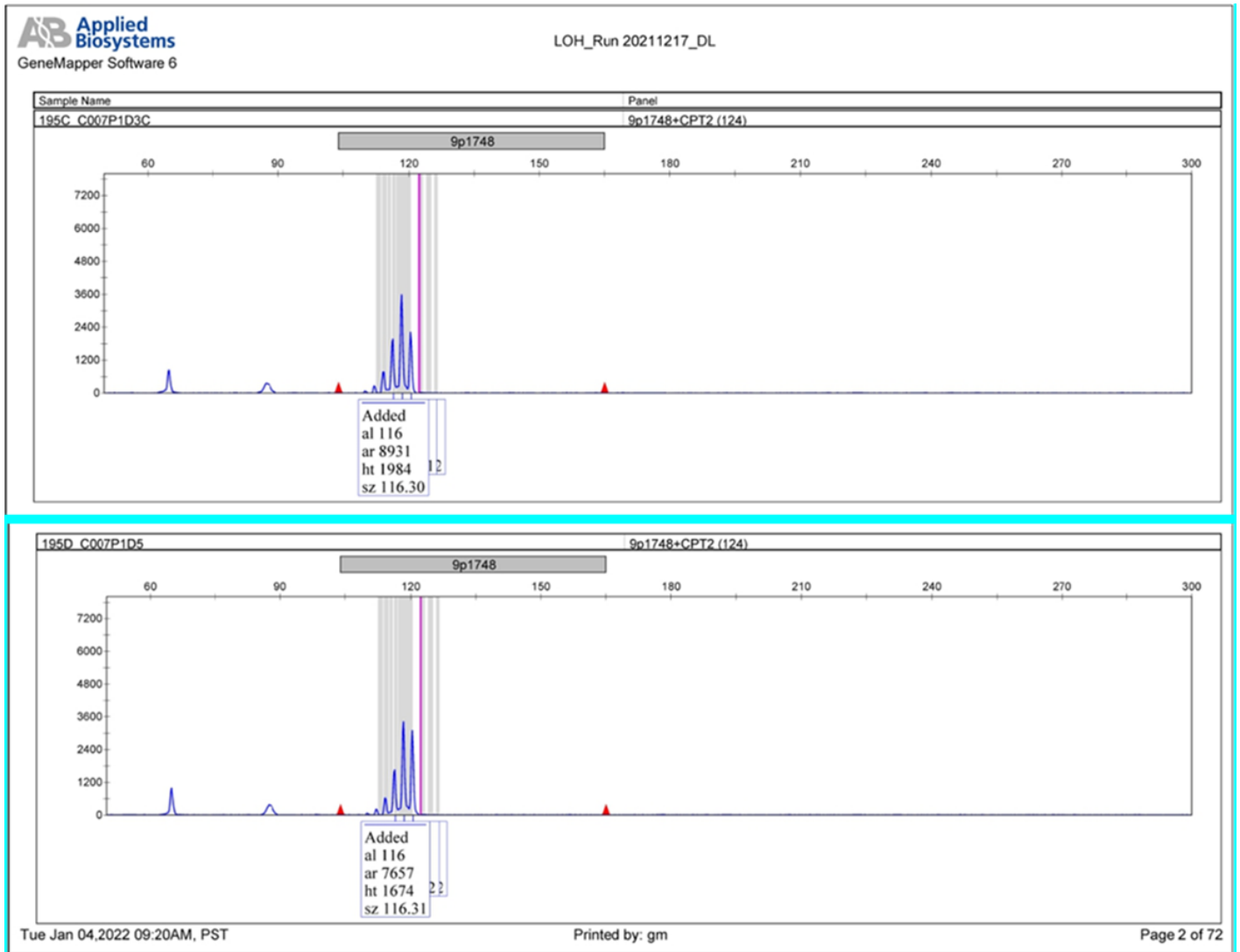
伍、 參考文獻:

1. Liu, K.Y.P., et al., *An actionable test using loss of heterozygosity in identifying high-risk oral premalignant lesions*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2017.
2. Poh, C.F., et al., *Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(22): p. 6716-22.
3. Poh, C.F., et al., *Fluorescence Visualization-Guided Surgery for Early-Stage Oral Cancer*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2016. **142**(3): p. 209-16.
4. Rosin, M.P., et al., *Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(2): p. 357-62.
5. Zhang, L., et al., *Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2012. **5**(9): p. 1081-9.
6. Parfenova, E., et al., *An improved algorithm using a Health Canada-approved DNA-image cytometry system for non-invasive screening of high-grade oral lesions*. J Oral Pathol Med, 2021. **50**(5): p. 502-509.
7. Liu, K.Y., et al., *Nodal Disease Burden for Early-Stage Oral Cancer*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2016. **142**(11): p. 1111-1119.
8. Liu, K.Y.P., et al., *Tumor microRNA profile and prognostic value for lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma patients*. Oncotarget, 2020. **11**(23): p. 2204-2215.
9. Zhang, L., et al., *Toluidine blue staining identifies high-risk primary oral premalignant lesions with poor outcome*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 8017-21.
10. Saini, R. and C.F. Poh, *Photodynamic therapy: a review and its prospective role in the management of oral potentially malignant disorders*. Oral Dis, 2013. **19**(5): p. 440-51.

附錄 FCE results

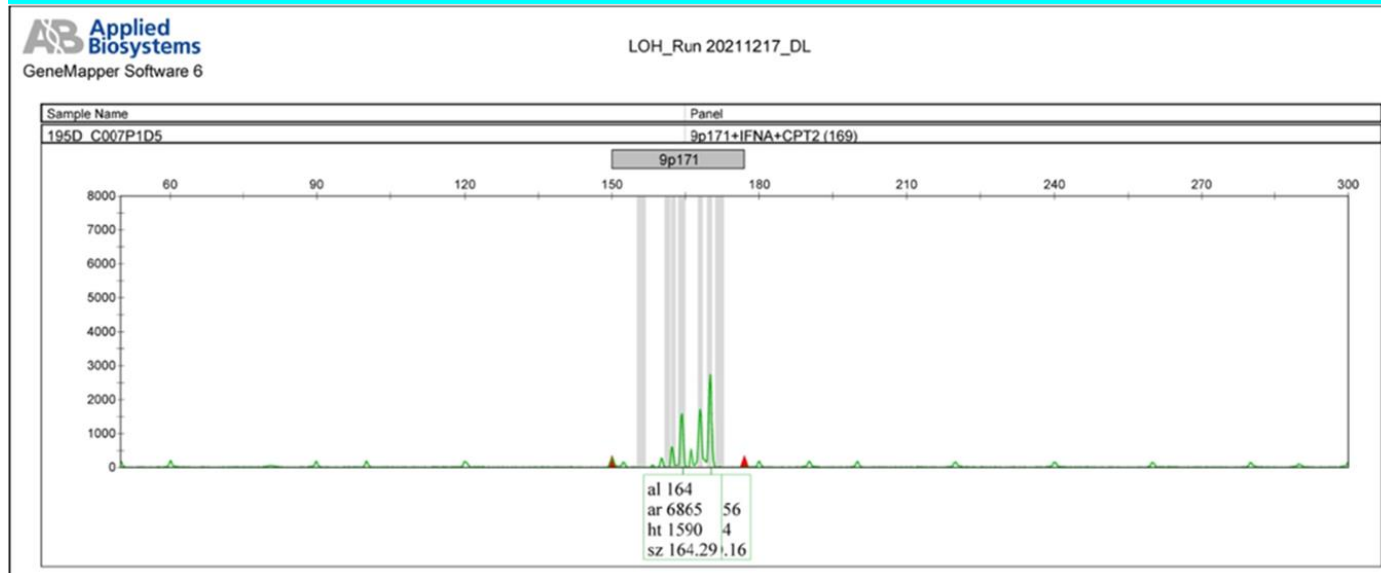
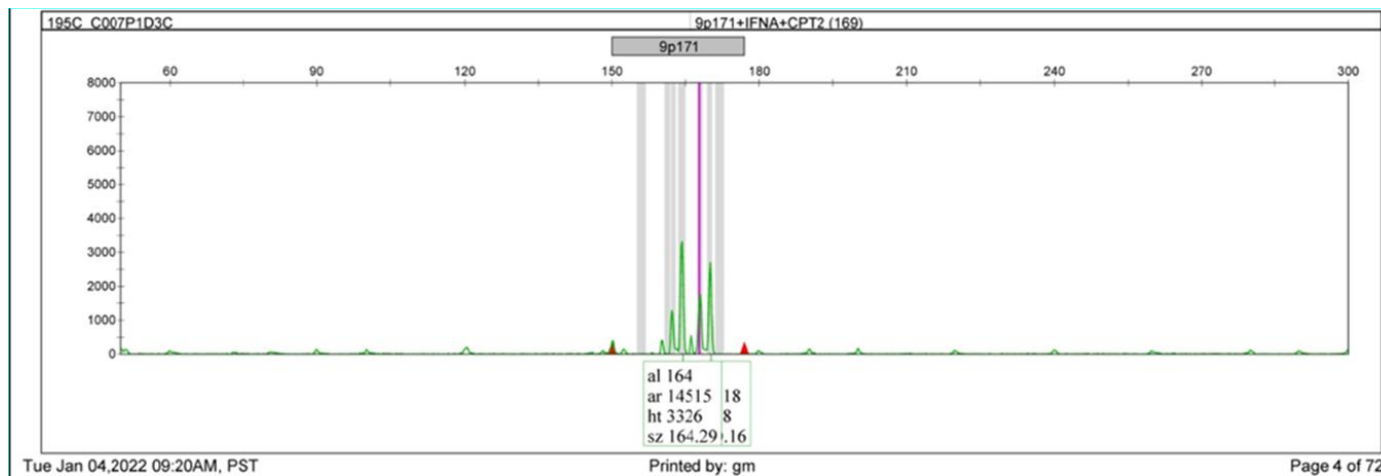
Triplet

Patient 196 9p1748 LOH



Doublet

Patient 195 9p 171 LOH

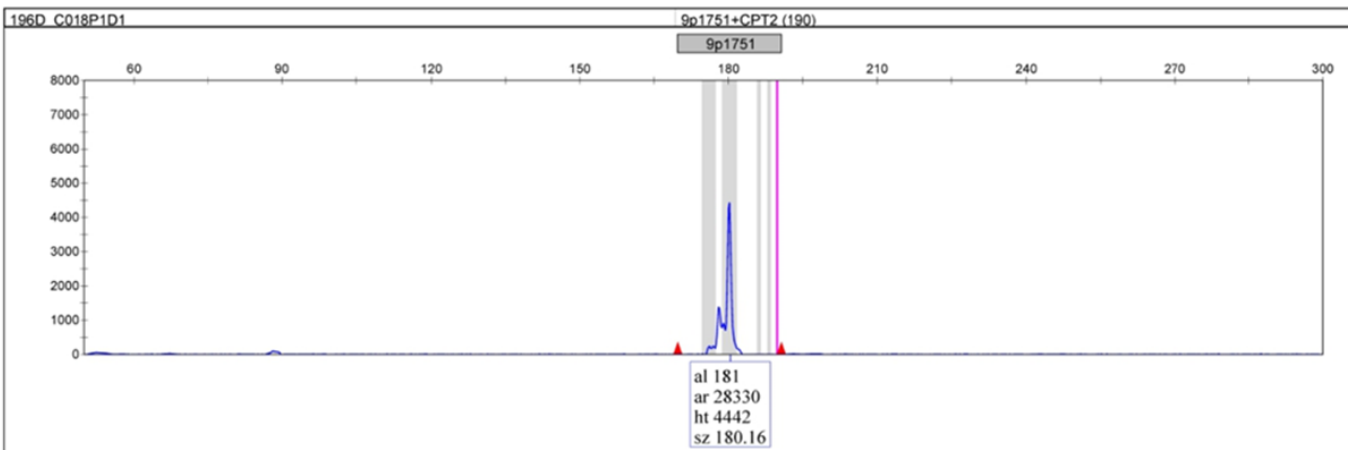
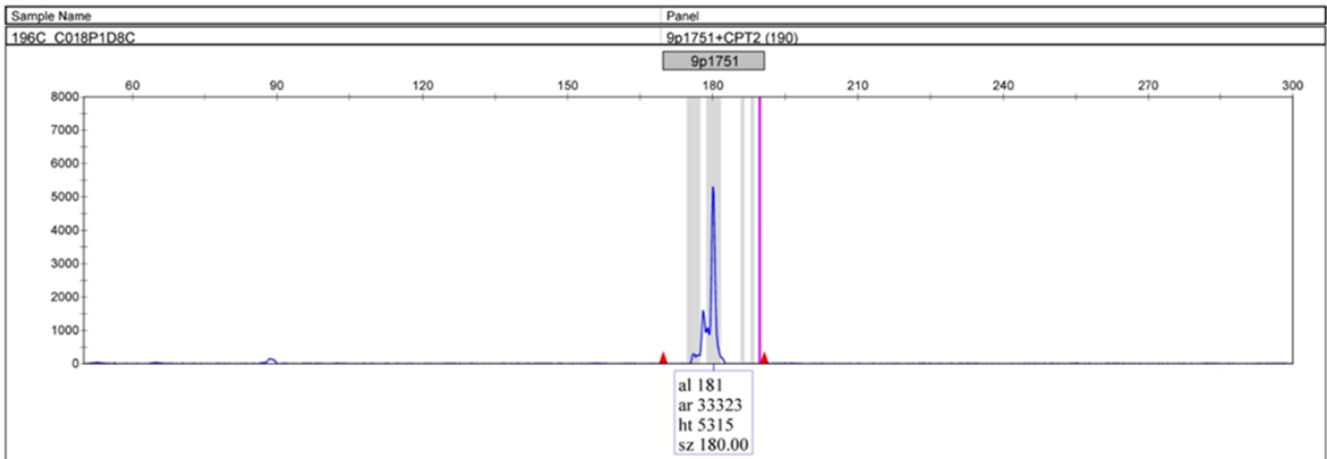


Homozygous

Patient 196 9p1751 LOH

Applied Biosystems
GeneMapper Software 6

LOH_Run 20211217_DL



ue Jan 04, 2022 09:20AM, PST

Printed by: gm

Page 44 of 72

CPT2 (190)

