顎口腔領域扁平上皮癌細胞の核 DNA 量と予後因子に関する研究
—核 DNA 量およびその変化と予後因子との相関について—

石田 寿夫

**A study of nuclear DNA content as prognostic value of
squamous cell carcinoma in the oral and maxillofacial region
—A retrospective study on relation of nuclear DNA content
to clinical and histological factors—**

Hisao ISHIDA

Abstract: 230 cases of primary squamous cell carcinoma of the oral and maxillofacial region were observed to determine the content of nuclear DNA by Feulgen-DNA microspectrophotometry at Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kobe University Hospital. The author reports here:

- 1) A new cell isolation technique for paraffin embedded tissue of squamous cell carcinoma
- 2) Relation between nuclear DNA content and clinical, histological characteristics
- 3) Prognostic factors by multiple regression analysis

There are various techniques reported in the field of microspectrophotometry for cell isolation from paraffin embedded tissue, but none of which was found to be successful for squamous cell carcinoma. The author has, therefore, established a new cell isolation technique suitable for paraffin embedded tissue of squamous cell carcinoma. The most unique feature is to make it easy to pick up a small tissue direct from a thick paraffin specimen, and collect a large number of cells. The nuclear DNA content was analyzed in comparison with clinical, histological characteristics and statistical observation. The data on the nuclear DNA content was evaluated by histogram, classified into the following items; (1) Mode, (2) Frequency of Mode, (3) Number of cells greater than $4n$, (4) Range, (5) Histogram Pattern, (6) Mean. Results indicate:

- Most cases of aneuploidy cell division pattern showed poor prognosis.
- Most cases of previous surgical treatment (tooth extraction, incision, puncture, etc.) at other medical and dental units prior to this department showed polyploidy nuclear DNA content, aneuploidy cell division, and poor prognosis.
- As a result of multiple regression analysis, it was found that on factors of previous surgical treatment at other medical and dental units and aneuploidy pattern of histogram adversely affected prognosis.

Amongst histogram evaluation items, histogram pattern is representative of malignancy of squamous cell carcinoma.

These facts indicate that nuclear DNA content of squamous cell carcinoma reflects a biological property to represent the malignancy of tumor and has significant relation to clinical and histological characteristics.

神戸大学医学部口腔外科学教室
(主任：島田桂吉教授)
Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

Faculty of Medicine, Kobe University (Chief:
Prof. Keikichi Shimada)
受付日：平成元年2月13日

And these findings suggest that the prognostic factors are of most importance for prospective therapy of squamous cell carcinoma of the oral and maxillofacial region.

Key words: nuclear DNA content (核 DNA 量), prognostic Factor (予後因子), multiple regression Analysis (重回帰分析)

はじめに

固形腫瘍の核 DNA 量測定に際して、多数の細胞分離法が報告されているが、扁平上皮癌に対し同じ方法を用いても、満足な結果が得られなかった。これまでの報告では腺系腫瘍を中心とした分離法がほとんどで、扁平上皮癌では細胞間結合の程度や様態が腺系腫瘍とは異なっているところに、その理由があると考えられる。そこで、顎口腔領域の扁平上皮癌細胞の分離法を確立するために、あらゆる方法を検討し、満足のいく分離法を見出した。この方法を利用し、最も発生頻度の高い扁平上皮癌細胞の核 DNA 量を種々の病態と比較検討した。

来院までの病態は発症、自覚より来院までの期間、当該疾患に対して施された外科的処置やその処置後来院までの期間とし、来院時の病態としては年齢、原発部位、TNM 分類、Stage 分類、核面積、組織学的分化度などを予後因子と設定して、それぞれの項目でパターン分析し、その関連性について検討した。また、治療法を始めとするさまざまな腫瘍の予後に関連する因子が腫瘍細胞の核 DNA 量の変化にどの程度相関するのかを知ることが、治療法の開発に重要な情報が得られ、その臨床的意義は大きいと考えられる。

核 DNA 量の解析は核 DNA 量ヒストグラムより並数(mode)、並数の度数(frequency)、変動幅(range)、4n以上の細胞数、ヒストグラムパターン分類、平均核 DNA 量の6項目を中心に行い、予後因子との相関について解析した。

本研究を通じて、顎口腔領域の扁平上皮癌細胞の核 DNA 量は腫瘍の性格(悪性度)を表現する細胞生物学的性状および予後因子との間に強い関連性があることが認められ、治療における重要な情報となることが示唆された。

細胞分離法について

細胞分離操作を行うにあたっては(a)常に安定した量を回収すること、(b)細胞に障害がみられないこと、(c)余分な debris の混入をできるだけ防ぐこと、(d)分離操作過程における核 DNA 量の質的变化が起こらないことの4点¹⁾を重点目標として検討した。

1. 材料と方法

扁平上皮癌患者10例の生検パラフィンブロックよりそ

れぞれ4 μ 、30 μ 、60 μ 、90 μ の連続切片を作成した。脱バラ後4 μ 切片は Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色、厚切り切片は Hematoxylin (H) 染色を施した。酵素学的処理として Collagenase (0.05%)、キレート剤として 2Na-EDTA (2.0%) を使用した。物理学的操作法としては各試薬処理後、実体顕微鏡下に4 μ H-E 染色を参考に組織採取し、スライドガラス上で眼科用尖刀を用いて掻き裂き、余分な debris を除去後、ただちに H-E 染色を施し、分離状態を検鏡し、試薬の作用時間、厚切り切片の程度を検討した。また、超音波処理法についてもその処理時間、および掻き裂き法との比較検討を行った。さらに、最も良い細胞分離条件下での操作に伴う細胞核 DNA 量の消長について検討を加えた。なお、試薬の反応温度は 37°C、pH 7.3、溶液は 0.2 M リン酸緩衝液とした。

2. 結果

a) 試薬の作用時間と切片厚さ

Collagenase (0.05%) 単独では 60 μ で60分作用させたものが良好であった。2Na-EDTA (2.0%) 単独では 60 μ 、130分で最も良好であった。次に 60 μ で Collagenase (0.05%) 50分 2Na-EDTA (2.0%) 100分を組み合わせて作用させたところ、細胞破壊は少なく、豊富な細胞が回収可能で、良好な分離状態が得られた。

b) 物理学的操作法

さらに、良好な細胞分離を得るため、以上の試薬で処理した後、超音波処理を施行した。処理時間は1分から10分までの1分間隔で行ったところ、5分処理が比較的分離が良好であった。しかし、超音波処理では裸核が多く、多数の細胞の破損がみられた(写真1)。それに反し、スライドガラス上で眼科用尖刀を用いた掻き裂き法では細胞集塊も散見されたが、裸核や破片細胞塊も少なく、十分な量の細胞を回収できた(写真2)。

c) 分離操作に伴う細胞核 DNA 量の消長

使用した材料は正常ヒト末梢リンパ球である。蛍光顕微鏡用スライドガラスに塗抹、乾燥した後、カルノア氏液にて固定、水洗し、前述の細胞分離操作と同一の条件、すなわち、H染色後、2Na-EDTA (2.0%) で100分間処理したものおよび Collagenase (0.05%) で30分、40分、50分、60分処理したものと分離操作を加えていない標本について柴谷、直良²⁾の Fuelgen 染色を施した。各標本50個のリンパ球の核 DNA 量を測定し、分離操作を加えていない標本の核 DNA 量の平均値を100%として減少率を求めたところ、H染色を施し、2Na-EDTA (2.0%)

写真 1 5分間超音波処理所見 (×200)
細胞量は少なく、裸核や細胞の破損がみられる。

写真 2 Collagenase (0.05%) 50分, 2Na-EDTA (2.0%) 100分処理後, 眼科用尖刀を用いた
掻き裂き法によって得られた細胞分離所見 (×200)

図 1 細胞分離操作に伴う核 DNA 量の消長について

に 100 分浸漬しても核 DNA 量の減少はほとんど認められなかった (図 1)。Collagenase (0.05%) の場合は 30 分で 2.5%, 40 分で 2.7%, 50 分で 3.1%, 60 分で 4.7% であり, 30 分から 50 分までは極端な差はみられなかった

が, 2Na-EDTA (2.0%) に比べ Collagenase (0.05%) は時間の経過に伴い, 核 DNA 量の減少が認められた。しかし, 吸光度曲線, 核 DNA 量ヒストグラムでの分布の変化などはみられなかった。

3. 小 括

従来より検討されている細胞分離法は酵素学的処理法, キレート剤を使用する方法, 物理学的方法に大別され, その各々が組み合わせられ, 検討されている。酵素学的処理法としては Bromeline, Trypsine, Collagenase, Dispase などがあげられるが, これらどの試薬でも, 新鮮組織や固定組織より細胞を分離する方法には一長一短があり, その単独使用では効果がないとの報告が多い^{1,3~11)}。Collagenase を使用した理由は上皮成分より間質成分に強く作用するとの報告³⁾があり, 本研究においても単独使用では上皮成分の細胞分離には満足な結果は得られなかった。しかし, Collagenase で処理することにより, 厚切り切片が非常に軟性で, 親水性となり実体顕微鏡下での小組織片採取が容易で, 目的とする部位が可及的に小範囲で採取することができた。一般に Collagenase の至適作用時間は 60 分とされているが, キレート剤である 2Na-EDTA 処理, 掻き裂き法を組み合わせることにより, 作用時間を 50 分に短縮することができた。Collagenase はリン酸緩衝液中では不安定であるので, リンガーロック液を溶媒として使用した。また, 一般に至適温度, 濃度は 0.025~0.1% とされているが, 0.05%, 37°C が最も適した条件であった。

キレート剤は 2Na-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) があげられる。細胞間結合は Ca^{2+} , Mg^{2+} のような 2 価イオンが重要な役割を果たしているといわれている。このような 2 価イオンを除去する目的でキレート剤を使用した。濃度については 2.5%, 3.5% で細胞間橋よりさらに細胞内への障害が多くみられ, 1.8% 以下では溶液の浸透圧が低下するため, 核内の空胞化が認められたとの報告³⁾もあり, 2.0% とした。作用時間は 2 時間で良好な結果が得られた報告⁴⁾があるが, 0.05% Collagenase 処理 50 分, 掻き裂き法を組み合わせたと, 100 分が良好な条件であった。2 時間以上作用させた結果, 裸核や破損した核が多く, 長時間の作用は不適と考えられる。

物理学的操作法では超音波処理^{3,4,7,10)}, 高速ブレンダー処理^{9,10)}, 金属メッシュによる強制濾過処理¹¹⁾, 尖刀で掻き裂く処理¹⁾, ハサミで小さくきざむ処理¹⁾, ピペットで洗う処理^{1,8)}, メスなどで薄く切る処理^{1,9)}, スターラー処理¹⁾ などがある。超音波処理に関して検討したところ, 5 分間処理が比較的良好であったが, 裸核や多数の細胞破損がみられ, 十分な細胞が回収できなかった。正常肝細胞を用いて細胞に加わる力を一定にすることから超音波の有効性を報告³⁾しているものもあるが, Trypsine と EDTA との併用時に 90 秒以上作用させると

表 1 顎口腔領域悪性腫瘍性別・部位別・組織別頻度
(昭和46年 1 月 1 日～昭和60年12月31日)

部位・性別 組織	上 顎		下 顎		舌		口 底		頬		口 唇		顎下腺		耳下腺		舌下腺		その他		合計
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
扁平上皮癌	54	46	62	29	50	30	19	4	6	10	3	2									315
腺 系 腫 瘍	11	8	8	5		2	4	1			1	1	7	4	2			1			55
間葉系腫瘍	5	8	4	3	1				1					1					4	4	31
悪性黒色腫	2	5	1																		8
転移性腫瘍		1	3	3																	7
そ の 他	1	2																			4
合 計	73	70	78	40	51	32	23	5	7	10	4	3	7	6	2			1	4	4	420 (例)

細胞破壊が生じるとの報告¹²⁾もある。また細胞破壊を招くため、すでに分散している細胞を最終段階で再度拡散させる程度の効果しかないとの報告⁹⁾もある。高速ブレンダーに関しては新鮮組織よりの細胞分離に使用され、多量な細胞数を必要とする FCM (Flow Cytometry) について検討されているが、細胞損傷は避けられない因子と報告^{9,10)}されている。金属メッシュを利用した強制濾過処理では、柴田ら¹¹⁾は Debris や細胞集塊の除去に有効であったと報告しているが、この処理方法は主に新鮮組織からの分離法で組織片を強制濾過させる場合、ある程度の大きさの組織片が必要と思われる。

本研究では0.05% Collagenase 処理50分、2.0% 2Na-EDTA 100分処理後、実体顕微鏡下で 4μ H-E 染色標本を参考に組織を採取し、別の蛍光顕微鏡用スライドグラス上で眼科用尖刀を用いて掻き裂き、目的とする細胞分離条件を得ることができた。これまで報告^{3,4)}されている固定組織よりの細胞分離法では厚切り切片より組織採取した後、試薬の処理が施されているが、組織採取時には厚切り切片は非常に脆く、目的とする部位が正確に採取できなかった。掻き裂き法では超音波処理などとは異なり、均一な力が加わらないと考えられているが、裸核や細胞破損などの障害が少なく、良好な操作法と考えている。これは正常肝組織のような均一な組織でなく、対象とした資料が扁平上皮癌であり、角化の存在や細胞間結合も不均一で細胞融解も進行している部位もあると考えられることから、むしろ不均一な力を加えた方が良好と考えている。掻き裂き法は操作が比較的簡単であり、余分な debris などの除去も容易であった。また同一スライドグラス上に目的とする細胞がより多く存在することは、常に安定した細胞数を回収するという条件にも一致している。この分離条件で核 DNA 量の消長を検討したところ、2.0% 2Na-EDTA 処理は核 DNA 量に変化なく、0.05% Collagenase 処理では50分で3.1%の減少率であった。

以上より本方法は定量的顕微分光測光法にとって、良

- (1) 来院までの因子
 - 自覚より来院までの期間 (日)
 - 他病院・開業医での当該疾患に対して施された処置
拔牙、切開搔爬、生検、試験穿刺、複数処置*
 - 他病院・開業医で当該疾患に対して施されて処置後、当科来院までの期間 (日)
- (2) 初診時の因子
 - 年齢 ○ 原発部位 ○ TNM 分類
 - Stage 分類 ○ 核 DNA 量 ○ 核面積
 - 組織学的分化度
- (3) 治療因子
 - 薬物療法 (M) ○ 放射線療法 (R)
 - 外科療法 (S) ○ MR 療法 ○ MS 療法
 - RS 療法 ○ MRS 療法

* 拔牙、切開搔爬、生検などが
組み合わせられ処置されている。

図 2 予後因子について

好な固定組織よりの細胞分離法と思われる。

核 DNA 量の検討

はじめに述べたように、扁平上皮癌細胞の核 DNA 量を測定し、病態および予後との比較検討を行い、予後に影響を与える因子の客観的評価基準の確立を目的とした。

1. 対象症例

昭和46年 1 月 1 日から昭和60年12月31日の期間に神戸大学医学部付属病院歯科口腔外科を受診した顎口腔領域の悪性腫瘍 420 例で、特に症例として多くみられた扁平上皮癌 315 例である (表 1)。

2. 方 法

扁平上皮癌患者の治療成績に影響を与える予後因子を

パラフィンブロックより 60 μ , 4 μ 連続切片作成
脱パラ後 60 μ 切片は Hematoxylin 染色, 4 μ は
Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色

60 μ 切片を

0.05% Collagenase を含むリンガーロック液で50
分処理

↓ 洗

2.0% EDTA を含む PBS 溶液 (0.2 M pH 7.3)
で100分処理

↓ 洗

実体顕微鏡下で H-E 染色標本を参考に組織採取
別のスライドガラス上で採取した組織を眼科用尖
刀で掻き裂く

↓ 乾燥, 固定

図3 固定組織よりの細胞分離法

決定した(図2). 因子としては(1)当科来院までの因子,
(2)当科初診時の病態因子,(3)治療因子に大別した。
これらの因子はカルテを中心に調査を行い, 記載
のないものは不明とした。腫瘍発生部位で, 上顎に関し
ては広範囲に進展した症例などでは原発部位が不明確な
ものが多かったため, 歯肉, 洞, 硬・軟口蓋を含めた。
TNM 分類, Stage 分類は UICC (1978) の診断基準に
従い, 病理組織学的分化度は WHO の病理組織学的診
断基準を参考とした。また, 生存率算定は臨床病理頭頸
部腫瘍取り扱い規約¹³⁾を参考に, 追跡基点は初診時, 追
跡日(最終確認日)は昭和60年12月31日とした。各々の
因子での生存率算定を行い, 核 DNA 量の評価について
検討した。

核 DNA 量測定は前述したごとく, 細胞分離を行っ
た。各症例未治療検体パラフィンブロックより 4 μ , 60 μ
連続切片を作成し, 図3のごとく操作した。Feulgen 染
色は柴谷, 直良²⁾の方法に準じて行い, 加水分解の条件
は末梢血リンパ球を対象に検討したところ, 1 N塩酸溶
液で 60°C 7分と決定した。

核 DNA 量測定はオリンパス製 MMSP を使用, 2
波長走査法¹⁴⁾で, 各症例 100 個の腫瘍細胞核 DNA 量を
測定した。対照は同一プレパラート上のリンパ球50個の
核 DNA 量を測定し, ヒストグラムを作成した。

核 DNA 量ヒストグラムの評価は従来の報告^{15~23)}を参
考に(a)並数(mode), (b)並数の度数(frequency),
(c)変動幅(range), (d)4n以上の細胞数, (e)ヒ
ストグラムのパターン分類, (f)平均核 DNA 量とし
た(図4, 5)。

ヒストグラムのパターン分類に関しては(a)2n域に
並数があり, 変動幅が3以下のものを単峰性, (b)2n
域に並数がみられるが, 4n域内にも1つのsubmodeが

A: 最小核 DNA 量

並数 (mode) = $B + \frac{f_2}{f_1 + f_2} C$ (C: 階級幅)

C: 最大核 DNA 量

D: 並数 (mode) の度数 (frequency)

□: 4n 以上の細胞数

$\frac{C-A}{2}$: 変動幅 (range)

図4 核 DNA 量ヒストグラムの評価法

(a) 並数 (mode)

(b) 並数の度数 (frequency)

(c) 変動幅 (range)

(d) 4n 以上の細胞数

(e) パターン分類

I 型: 単峰性

III 型: 3 峰性

II 型: 双峰性

IV 型: 多峰性

(f) 平均値 (mean)

図5 核DNA量ヒストグラムの評価項目

あり, 変動幅が3~4.5のものを双峰性, (c) 3n~4n
に並数があり, 4n域以上にも2つのsubmodeがみら
れ, 変動幅が4.5~7のものを3峰性, (d) 並数が不明
確で変動幅が7以上のものを多峰性とした。

腫瘍細胞核面積は対話式自動画像解析装置 IBAS (KA-
RL ZEISS 社製) で各症例100個の腫瘍細胞核を測定し,
その平均値を算出した。

3. 結果

核 DNA 量測定が可能であったのは 230 例である。

a) 並数 (mode)

平均値は 3.98n で 4n 付近を peak とするほぼ対称形
となる分布を示した。各因子との比較では, 抜歯, 切開
処置症例, 外科的処置後来院までの期間が21日以上
の症例, 組織学的に低分化型症例や 4n 以上の細胞数
が50個以上の症例, 並数の度数が0~19個の症例
では 5n 付近を peak とする分布を示し, 並数の増加
傾向がみられた。核面積が 30~39 μm^2 の症例は
3n 付近に peak がみられ, 並数の減少を示した
(図6)。

予後は並数を 2n から 6n まで区切って比較すると,
並数の増加が予後不良傾向にあるが, 明らかな結
果は得られなかった(図7)。

b) 並数の度数 (frequency)

図 6 並数 (mode) について

図 7 並数 (mode) の区分別生存率曲線
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)
(Kaplan-Meier 法)

平均値は 25.17 個で25～29個付近を peak とする分布がみられた。各因子との比較では、発症、自覚より来院までの期間が90日以上症例、拔牙・切開などを含む複数処置症例、組織学的に中、低分化型症例や4n以上の細胞数が50個以上の症例では度数が20～24個付近に peak がみられ、特に T₄ 症例や平均核 DNA 量が5n以上の症例では度数が0～19個に peak を示す分布を示し、核 DNA 量ヒストグラムの扁平化傾向がみられた。平均核 DNA 量が2～3.99n症例や4n以上の細胞数が0～29個の症例は度数の増加傾向がみられた (図8)。

図 8 並数の度数 (frequency) について

図 9 並数の度数 (frequency) 区分別生存率曲線
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)
(Kaplan-Meier 法)

予後は度数を0～19個、20～24個、25～29個、30個以上の4群に区別して比較したところ、0～19個の群は不良であった (図9)。

c) 4n以上の細胞数

平均値は41.7個で40～49個を peak とする、比較的穏やかな分布曲線がみられた。各因子との比較では拔牙、切開処置症例、年齢別で0～39歳症例、組織学的に中、低分化型症例や変動幅が5以上の症例、多峰性症例では増加傾向を示し、polyploidy な傾向がみられた。減少傾向は生検処置症例、変動幅が1～2.9の症例や単峰性

図 10 4n以上の細胞数について

図 12 変動幅 (range) について

図 11 4n以上の細胞数の区分別生存率曲線
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)
(Kaplan-Meier 法)

症例にみられた。Stage 分類や核面積などでは明らかな差はみられなかった(図10)。

予後は4n以上の細胞数を0～29個、30～49個、50個以上の3群を比較したところ、4n以上の細胞数が増加するほど不良であった(図11)。

d) 変動幅 (range)

平均は5.12で、変動幅が3～4.9をpeakとする分布曲線が得られた。各因子との比較では抜歯、切開、外科的複数処置症例、T₃、T₄症例、組織学的に中、低分化型

図 13 ヒストグラムパターンについて

図 14 ヒストグラムパターン別生存率曲線
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)
(Kaplan-Meier 法)

図 16 平均核 DNA 量区分別生存率曲線
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)
(Kaplan-Meier 法)

図 15 平均核 DNA 量について

症例や 4n 以上の細胞数が 50 個以上の症例、並数が 5n、6n 症例に増幅がみられた。また、平均核 DNA 量が 5n 以上の症例や核面積が 50 μ m² 以上の症例でも増幅傾向を示した (図12)。

e) ヒストグラムパターン

3 峰性に peak を有する分布を示した。各因子との比較では、ほとんど 3 峰性に peak を示す分布曲線がみられたが、並数の 6n 症例では多峰性に peak を呈する分布曲線がみられた。また、抜歯、切開処置症例、T₁ 症例、組織学的に中、低分化型症例も多峰性になる傾向が

みられた。外科的処置後来院までの期間、N 分類、核面積では明らかな変化はみられなかった (図13)。

予後は多峰性が不良で、aneuploidy な細胞分裂像の増加が不良傾向を示していた (図14)。

f) 平均核 DNA 量

4n 付近を peak とする分布がみられた。各因子との比較では 4n 付近を peak とする分布がみられたが N₂ 症例、組織学的に中、低分化型症例、4n 以上の細胞数が 50 個以上の症例、並数が 6n 症例、多峰性症例などでは 5n 付近に peak を示す分布がみられた。4n 以上の細胞数が 0~29 個の症例や並数が 3n の症例などでは平均核 DNA 量の減少がみられた (図15)。

予後は症例として少ないが、平均核 DNA 量が 6n 以上の症例では不良であった (図16)。

核 DNA 量の変化と予後因子との関連について

以上のごとく、各因子間において重クロス集計を行い、比較検討したが、各因子がどの程度予後に、各因子間同士がどのように関連し合っているか、さらに定量的に決定されれば、今後臨床において有益であると思われる。その場合、多数の因子が同時に解析されることが望ましく、そのため多変量解析である線形重回帰モデル (Linear Multiple Regression Model)²⁹⁾ を使用し検討した。

1. 方法

予後に直接または間接に関与していると考えられる因子は 図17 のごとく、X₁~X₁₇ を決定し、説明変数とした。X₁~X₁₂ は、数値データであり、連続変数としてそれぞれの数値をそのまま用いた。X₁₃~X₁₈ は層別変数であり、数量化を行った。X₁₃ の性別ではカテゴリーが男性、女性の 2 個なので、この場合は男性 ; 0、女性 ; 1

<連続変量>

- X₁ : 年齢, X₂ : T分類, X₃ : N分類
- X₄ : 核 DNA 量ヒストグラムの並数
- X₅ : 核 DNA 量ヒストグラムの並数の度数
- X₆ : 核 DNA 量ヒストグラムの4n以上の細胞数
- X₇ : 核 DNA 量ヒストグラムの変動幅
- X₈ : 平均核 DNA 量
- X₉ : 腫瘍細胞核面積
- X₁₀ : 自覚より来院までの期間
- X₁₁ : 他病院・開業医での当該疾患に対する外科的処置後, 来院までの期間
- X₁₂ : Stage 分類

<層別変量>

- X₁₃ : 性別 (k=2), X₁₄ : 原発部位 (k=6)
- X₁₅ : 治療法 (k=7)
- X₁₆ : 組織学的分化度 (k=3)
- X₁₇ : 核 DNA 量ヒストグラムパターン分類(k=4)
- X₁₈ : 他病院・開業医での当該疾患に対する外科的処置 (k=5)

図 17 重回帰分析における説明変数

Y =

−0.00638 * X (1)

+ −0.17828 * X (2)

+ −0.07281 * X (3)

+ −0.05845 * X (4)

+ −0.22867 * X (5)

+ 0.01847 * X (6)

+ −0.07966 * X (7)

+ −0.18650 * X (8)

+ −0.05056 * X (10)

+ 0.51296 * X (12)

+ −0.22200 * X (13)

+ 0.22179 * X (15)

+ −0.11713 * X (19)

+ −0.04391 * X (20)

+ 0.31456 * X (21)

+ −0.09164 * X (22)

+ 0.00116 * X (24)

+ −0.15620 * X (28)

+ −0.22300 * X (29)

+ −0.07717 * X (30)

+ 0.26594 * X (31)

+ 1.97620

図 18 5年観察期間における最良予測式

とした。X₁₄ から X₁₈ まではカテゴリーが2個以上のため、カテゴリーがk個の場合、(k-1)個の定義変数(dummy variable)を定めた。

		回帰係数	標準回帰係数
年 齢	(X ₁)	−0.00638	−0.18747
T	(X ₂)	−0.18650	−0.30497
平均核 DNA 量	(X ₈)	−0.09164	−0.13210
核面積	(X ₉)	0.00116	0.06757
性 別	(X ₁₃)	−0.17828	−0.17359
上 顎	(X ₁₄)	−0.07281	−0.07301
下 顎		−0.05845	−0.05659
舌		−0.22867	−0.20737
頬		0.01847	0.00889
口腔底		−0.07966	−0.04261
MRS	(X ₁₅)	−0.05056	−0.06119
MS		0.51296	0.32868
MR		−0.22200	−0.23545
R		0.22179	0.12505
多峰性	(X ₁₇)	−0.11713	−0.11194
3 峰性		−0.04391	−0.05212
双峰性		0.31456	0.27795
抜 歯	(X ₁₈)	−0.15620	−0.24382
切 開		−0.22300	−0.26493
生 検		−0.07717	−0.09920
複 数		0.26594	0.35964
		C=1.97620	
		R ² =0.46650	

図 19 5年観察期間について

従属(目的)変数は5年観察期間群, 10年観察期間群に分類し, その期間内での予後で, 腫瘍死; 0, 生存; 1として解析した。なお, 各期間での他病死, 追跡不明症例は除外した。

重回帰分析上, 因子の選択方法は逐次選択法(Stepwise Method)である変数増減法²⁹⁾を用いた。5年観察期間群, 10年観察期間群での最良予測式, 各因子の重み, 各因子間の相関の有無などについて検討した。

2. 対象症例

扁平上皮癌患者315例で核DNA量が測定可能であった230例である。

3. 結 果

5年観察期間群は137例, 10観察期間群では46例であった。

a) 5年観察期間群

年齢(X₁), 性別(X₂), 原発部位(X₃₋₇), T分類(X₈), 治療法(X₁₀₋₁₅), 核DNA量ヒストグラムパターン(X₁₉₋₂₁), 平均核DNA量(X₂₂), 核面積(X₂₄), 他病院・開業医での当該疾患に対する外科的処置(X₂₈₋₃₁), Stage分類(X₃₃), を組み合わせた重回帰式(予測式)が最良であった(図18)。重みを考慮した場合, 図19のごとく, 予後不良へと作用する因子としては切開, 抜歯処置, MR

Y

$-0.18206 * X (2)$

$+ -0.28514 * X (\infty)$

$+ -0.09401 * X (9)$

$+ -0.12214 * X (16)$

$+ -0.03875 * X (17)$

$+ -0.00880 * X (24)$

$+ 0.00088 * X (27)$

$+ 0.06642 * X (28)$

$+ -0.70927 * X (29)$

$+ -0.43446 * X (30)$

$+ 1.17914 * X (31)$

$+ -0.00637 * X (32)$

$+ 2.90630$

図 20 10年観察期間における最良予測式

		回帰係数	標準回帰係数
T	(X ₂)	-0.28514	-0.47844
N	(X ₃)	-0.09401	-0.17684
並 数	(X ₄)	-0.12214	-0.20745
変動幅	(X ₇)	-0.03875	-0.17013
核面積	(X ₉)	-0.00880	-0.18437
自覚より来院ま での日数	(X ₁₀)	0.00088	0.19243
外科処理より当 科手術までの日数	(X ₁₁)	-0.00637	-0.37915
性 別	(X ₁₃)	-0.18206	-0.17492
抜歯処置	(X ₁₈)	0.06642	0.10343
切開処置		-0.70927	-0.79238
生検処置		-0.43446	-0.48537
複数処置		1.17914	1.20160
		C=2.90630	
		R ² =0.58201	

図 21 10年観察期間について

療法，T分類，舌原発部位の順でみられた。予後良好へと作用する因子としては生検処置，MS療法，双峰性パターンの順でみられた。各因子間の相関はヒストグラムパターンと並数，変動幅，4n以上の細胞数，並数の度数，組織学的分化度が互いに強い相関を有し，並数と平均核DNA量の間にも相関がみられた。また，N分類とStage分類の相関がみられたが，T分類とStage分類には明らかな相関はみられなかった。

b) 10年観察期間群

重回帰式(予測式)は性別(X₂)，T分類(X₈)，N分類(X₉)，並数(X₁₆)，変動幅(X₁₇)，核面積(X₂₄)，発症，自覚より来院までの期間(X₂₇)，他病院・開業医での当該疾患に対する外科的処置(X₂₈₋₃₁)，外科的処置後来院までの期間(X₃₂)を組み合わせたものが最良であった(図20)。重みとしては図21のごとく，予後不良へと作用す

図 22 自覚より当科来院までの期間
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)

図 23 自覚より当科来院までの期間別生存率曲線
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)
(Kaplan-Meier 法)

る因子は切開処置，外科的複数処置，T分類，並数，核面積の順にみられた。予後良好へと作用する因子は生検，抜歯処置，発症，自覚より来院までの期間の順にみられた。各因子間の相関では変動幅，4n以上の細胞数，並数の度数，組織学的分化度，平均核DNA量の間には互いに強い相関を有していたが，並数とは相関はみられなかった。また，N分類と治療法，Stage分類の間にも相関がみられたが，T分類とStage分類には明らかな相関はみられなかった。

考 察

日常臨床において，発症，自覚より来院までの期間が比較的短いにもかかわらず，腫瘍が広範囲に進展した症例を経験したりすることがある。また，相当長期間を経

表 2 自覚より当科来院までの期間別 TN 分布

T 分類	1	2	3	4
0～29	9	15	29	20
30～59	4	19	23	27
60～89	3	17	14	13
90～119	1	5	8	9
120日以上	7	23	22	24(例)

N 分類	0	1	2	3
0～29	31	17	7	18
30～59	24	25	12	12
60～89	25	8	3	11
90～119	10	5	4	4
120日以上	24	23	10	17(例)

ているにもかかわらず、それほど進展していない症例もある。このような症例は自覚時期に腫瘍がどのように存在していたかは問診に頼る以外に手段はないが、初診時の TNM 分類と初発より来院までの期間中における癌の発育速度^{30,31)}(倍加時間)および領域リンパ節への進展などが治療予後を左右する重要な因子となることが多いので、癌の細胞生物学的性状を正確に把握することが重要である。癌の性格を客観的に知る方法の一つに核 DNA 量を正確に測定し、比較検討することが多方面で行われている^{15～28)}。本研究の目的は初診時の病態はもちろんのこと、当科来院までの期間における治療行為なども含めて、その間における癌に与える影響因子を検討し、腫瘍細胞の核 DNA 量を指標に、より客観的な予後に関する要因を明確にすることである。

固形腫瘍の核 DNA 量の測定に際しては、一般に定量的顕微分光測光法が用いられているが、対象とする組織密度が高い場合には、核の重なりなどにより、切片上での測定では正確な結果が得られない欠点がある。これまで報告されている細胞分離法で扁平上皮癌を対象に施行したところ、満足な結果が得られなかった。扁平上皮癌に対する細胞分離には他の方法による必要があると思われる。そこで、著者があらゆる細胞分離法を再検討し、特に岩佐³⁾および Takamatsu ら⁴⁾の肝細胞や心筋、小脳組織を対象とする超音波を利用した細胞分離法に着目し、扁平上皮癌の細胞分離に応用し、工夫したところ、良好な分離条件を得ることができた。本法の特長は組織切片上で目的とする部位の組織片が極小でよく、重なり合うことなく、細胞が同一プレパラート上にあり、回収することが可能である。

発症、自覚より来院までの期間は患者個人の性格とか、社会条件などによりさまざまだが、期間を知る手段は問診以外になく、その内容は図22のごとく、2か月か

拔牙単独例について (46例)

受診経路	
歯科……………	31(例)
{ 紹介……………	27}
{ 紹介なし……………	4}
歯科→歯科……………	8
外科→歯科……………	1
歯科→内科……………	1
内科→歯科……………	1
歯科→耳鼻科……………	1
歯科→内科→外科……………	1
歯科→整形外科→脳外……………	1
歯科→耳鼻科→外科→歯科……………	1

切開単独例について (17例)

受診経路	
歯科……………	9(例)
{ 紹介……………	8}
{ 紹介なし……………	1}
歯科→歯科……………	3
外科……………	2
内科→歯科……………	1
歯科→内科……………	1
歯科→神経科→外科……………	1

その他の単独処置
切除 (1例), 試験穿刺 (例3), 根管治療 (1例), 口腔内印象 (1例)

生検単独例について (33例)

受診経路	
歯科……………	5(例)
耳鼻科……………	4
外科……………	4
歯科→歯科……………	4
内科……………	2
歯科→外科……………	1
外科→歯科……………	1
内科→歯科……………	1
内科→耳鼻科……………	1
外科→外科……………	1
外科→放射線科……………	1
耳鼻科→放射線科……………	1
整形外科→外科……………	1
耳鼻科→耳鼻科……………	1
耳鼻科→歯科→歯科……………	1
耳鼻科→歯科→放射線科……………	1
歯科→外科→歯科……………	1
内科→耳鼻科→歯科……………	1
内科→耳鼻科→歯科→内科→歯科……………	1

<拔牙された歯牙部位別頻度>

(3) (7) (1) (1) (1) (2) (1) (1)	(1)	(2) (1) (3) (5)	
8 7 6 5 4 3 2 1	1 2 3 4 5 6 7 8		歯式
8 7 6 5 4 3 2 1	1 2 3 4 5 6 7 8		
(2) (3) (1) (1) (1) (1) (2) (3)	(2) (1) (1)	(4) (6) (7)	

() 内はのべ症例数

図 24 当科来院までに施された単独の外科的処置内容と受診経路について
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)

受診経路 (例)

歯科	11
歯科→歯科	10
歯科→外科	3
内科→歯科	2
外科	2
歯科→耳鼻科	1
耳鼻科→歯科	1
外科→内科	1
歯科→歯科→歯科	1
歯科→外科→歯科	1
歯科→耳鼻科→耳鼻科	1

処置内容 (例)

切開→拔牙	6
拔牙→切開	3
拔牙→生検	3
拔牙→拔牙	2
生検→生検	2
拔牙→搔爬→拔牙→搔爬	1
拔牙→拔牙→拔牙	1
拔牙→切開→拔牙	1
根管治療→試験穿刺	1
拔牙→切開搔爬→歯肉切除	1
拔牙→義歯作成→拔牙	1
歯肉切除→歯肉切除	1
硝酸銀塗布(10回)→義歯作成→生検	1
切除→搔爬→切除→拔牙→拔牙→切除	1
拔牙→切除→切除→切除	1
その他	8

図 25 当科来院までに施された外科的複数処置内容と受診経路について (昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)

図 26 他病院・開業医での外科的処置別生存率曲線 (昭和46年1月1日～昭和60年12月31日) (Kaplan-Meier 法)

表 3 他病院・開業医での外科的処置別 TN 分布

T	1	2	3	4
無 処 置	19	53	57	61
拔 歯	1	10	18	10
複数処置	1	5	11	12
生 検	3	12	5	8
切 開	0	2	4	6(例)

N	0	1	2	3
無 処 置	71	54	20	48
拔 歯	17	9	6	7
複数処置	9	7	6	7
生 検	17	5	2	4
切 開	3	2	4	3(例)

ら3年の期間である。6か月以内が過半数を占めている。各期間の予後を比較すると図23のごとく、1か月以内が予後不良であり、この因子だけでは断定できないが、来院までの期間が長いものが予後不良であるとはいえないようである。また、TNM 分類で比較しても表2のごとく、期間の長いものが臨床的進展度が大きいとはいえないようである。癌の一つの特徴である発育速度に関連しているのではないかと推察される。

顎口腔領域の悪性腫瘍は典型的な病態を示すものから、他疾患とまぎらわしい病態を示すものまで多彩である。また、来院までに他医療機関で治療行為を受けているものも多い(図24、25)。癌病巣に対し拔牙、切開などの外科的処置が多くみられる。そのような処置の結果、治癒不全や急激な腫瘍増大などの症状を呈する症例もあれば、何回となく外科的処置を繰り返しても、最初はそれほど著明な反応を示さず、非常に静的な反応を呈する症例もある。複数の外科的処置を受けた症例では悪性腫瘍の疑いも持たず、拔牙、切開、搔爬などが繰り返

返し施され、次第に症状が増悪して、当科に来院したものが多く、図26のごとく、事前に外科的処置を受けた拔牙、切開処置群は予後不良である。しかし、TN 分類との比較では明確な有意の差はみられない(表3)。

癌病巣に対する外科的処置は一般に禁忌とされているが、これは主に経験的観念により述べられていて、客観的な指標はみあたらないようである。前述したように外科的処置を施されて後、症例により、その症状の違いがみられる。参考までに外科的処置を施された後、当科来院までの期間をみると、図27のように30日以内までに来院している症例が多くみられ、症状悪化が早期に出現した症例が多い。しかし、比較的長時間を要している症例もみられることから、刺激を受けてもそれほど急激な反応を呈さない腫瘍もあることがうかがえる。期間別の予後では明らかな差は認められない(図28)。このような所見より、外科的刺激に対する腫瘍の反応の違いも検討する必要があると思われる。外科的な刺激により、その環境に適した細胞群が種族細胞³²⁾として派生し、もとも

図 27 外科的処置後当科来院までの期間について
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)

図 28 他病院・開業医での外科的処置後当科来院
までの期間別生存率曲線
(昭和46年1月1日～昭和60年12月31日)
(Kaplan-Meier 法)

との腫瘍の発育，増殖パターンが変化するため，臨床的に異なった病態像として出現するのかも知れない。どのような経過で来院したかといった動態を核 DNA 量の中から比較検討することで，さらに客観的有効な情報を得

ることができるのではなかろうかと思われる。このような点に関しても，予後に影響を与える重要な因子と考えている。

核 DNA 量ヒストグラム評価法については多数報告¹⁵⁻²⁵⁾されているが，基準の明確でないものが多いようである。並数 (mode) とは統計学的には平均の概念の一つで，この値は極端な値を持った小数の変量にはまったく左右されないものであり，集団のある傾向を表わす時などによく用いられている³³⁾。最頻値と報告^{22, 26-28)}されているものは，ヒストグラムで最も度数の占める割合が大きいクラスの数であり，その前後のクラスは無視されている場合がほとんどで，本来は統計学的に無視してはいけぬものであると考えられている³³⁾ (図4)。本研究では4n付近を peak とする分布曲線が得られた。これは種族細胞説^{32, 34)}や Ising ら³⁵⁾の指摘している種族細胞の染色体数の最適領域から考えると，本研究における扁平上皮癌の最適領域は4n付近にあると考えられる。並数が4n以上の高値を示したのは抜歯，切開症例，外科的処置後來院までの期間が21日以上症例や組織学的に低分化型症例である。抜歯，切開症例では外科的な刺

激により、腫瘍内の環境が変化し、それに適応しつつ、種族細胞の最適領域が高値へと変化したのかも知れない。また、組織学的に分化度が低いものは、本来の特性として、種族細胞の最適領域が高い傾向にあるのかも知れない。4n以上の細胞数が50個以上の症例、並数の度数が0~19個の症例では並数の増加傾向がみられることから、並数が細胞増殖パターンを表現している項目として重要な意味を持っているものと思われる。並数の低下傾向は腫瘍核面積が30~39 μm^2 群の症例で、これまでの報告^{17,21,26)}とはほぼ一致している。核面積と並数の関係は図6のごとく、ほぼ平行関係にあり、本研究における扁平上皮癌の種族細胞の最適領域である4n付近の核面積は40~49 μm^2 と思われる。核面積は核の長径と短径の積で表わされていた報告^{17,21,26)}が多く、形状が一定していない癌細胞核では非常に誤差の大きい所見と思われる。しかし、本研究においてはこのような誤差を避けるため、対話式自動画像解析装置 IBAS (KARL ZEISS 社製)を使用した。

予後は並数の増加が不良傾向を示しているが、3nと4n群では3n群が予後不良傾向にあり、Aneuploidyな細胞増殖パターンにある症例では予後不良と考えられる(図7)。

並数の度数 (frequency) は核 DNA 量ヒストグラムの扁平化傾向 (高さ) を表現する目的で検討した。全症例では25~29個に peak を有する分布がみられた(図8)。低下傾向を示したのはT₁症例、平均核DNA量が5n以上の症例である。その他の因子との比較では明確な判別はできなかった。このような所見より、核DNA量ヒストグラム評価においては並数の方が有効な指標となり得ると考えている。

予後については0~19個群が不良で、ヒストグラムの扁平化傾向にあるものは予後不良傾向がみられ、諸家の報告²⁵⁾と一致していた(図9)。

4n以上の細胞数については、正常細胞と癌細胞の大きな違いは4n以上の細胞の出現率であり、癌診断基準として有用であるとの報告^{16,15,20,26~28,36)}もあるように、正常細胞ではみられず、癌細胞では幅広い変動がみられ、polyploidyな細胞が増加するのが特徴とされていることから、その頻度も評価した。悪性腫瘍におけるこのような特徴は染色体研究において、染色体個々の全体的、部分的変化—不分離、欠損、転座、逆位、または倍体化、脱落などがたびたび繰り返された結果であろうと考えられている^{37,38)}。また、高倍体細胞の成因として、染色体倍加と細胞質不分離という分裂異常や細胞相互の融合も考えられている³⁹⁾。それは endomitotic reduplication として記載されている分裂異常は静止核の間に染色体が倍加していると信じられている³⁹⁾。Razzaq⁴⁰⁾は大腸癌で6%以上、広瀬⁴¹⁾は胃癌で6.8%以上、北島²⁰⁾は舌癌の病巣外層で28%、内層で17.2%、中村⁴²⁾は

子宮頸癌で95.2%、百瀬²²⁾はヒト口腔扁平上皮癌由来培養細胞での検討で6%以上と報告している。諸家により一定していないが、核DNA量ヒストグラムパターン分析において、4n以上の細胞数を重要視し、診断基準にしている報告^{16,18,20,26~28,36,41)}は多い。本研究においても4n以上の細胞数の平均出現率が約41.7%にみられた。各因子との比較では抜歯、切開処置症例、組織学的に分化度が低い症例、変動幅が5以上の症例、多峰性症例では4n以上の細胞の出現率が増加している。これは核DNA量の増加、polyploidizationを意味し、核DNA量ヒストグラムの扁平化傾向を示し、諸家の報告^{16,18,20,26~28,36,41)}と一致している。特に抜歯、切開処置症例などと比較した報告はこれまでみあたらないが、前述したように癌の進展発育過程において、種族細胞は一定不変ではなく、外科的刺激により、その環境に適した細胞が選択され、本来の癌細胞分裂パターンが変化したものと考えている。しかし、外科的処置を施された症例でも4n以上の細胞数が30%以下の症例は抜歯処置4例(12.5%)、切開処置3例(25%)、外科的複数処置2例(6.67%)にみられた。これらの症例においては臨床および病理組織学的に共通な所見はみられなかった。予後は4n以上の細胞出現率が高いものほど不良傾向がみられる(図11)。この所見は諸家の報告と共通しており、Atkinら⁴³⁾は卵巣悪性腫瘍で high-ploidy のものが予後不良傾向があると述べているし、Caspersen⁴⁴⁾は乳癌で、Cuveilierら⁴⁵⁾は骨肉腫で、Tavaresら⁴⁶⁾は膀胱癌、前立腺癌について、三戸ら^{47,48)}は食道癌、胃癌について、その分布と予後がよく相関すると報告している。しかし、Greisenら⁴⁹⁾の悪性度の高い肺の小細胞癌で核DNA量分布がそれほど広範に分散していないものがあるとの報告や Doyle⁵⁰⁾の口腔扁平上皮癌症例で核DNA量から正常上皮と区別する場合は注意を要するとの報告もあることから、単純に癌の悪性度に関係づけることは慎重に考慮しなければならないと考えている。このような見解より核DNA量ヒストグラムについて、さらに変動幅、パターン分析を行った。

変動幅 (range) は散布度²²⁾などとも表現されているが、並数では無視される極端な値を持った小数の変量を検討するため用いた。これはヒストグラムのばらつき、散らばりなど、横の変化の評価が可能であると思われる。各因子との比較では並数で検討した所見に加えて、外科的複数処置症例、T₃、T₁症例、4n以上の細胞数が50個以上の症例、並数が5n以上の症例や平均核DNA量が5n以上の症例では増幅がみられた。並数だけで検討した場合と比較して、さらに多くの判別し得なかった因子がみられることから、種族細胞説の観点からだけでは説明できない癌の病態がうかがえるのではなからうか。佐藤ら³⁵⁾は染色体を表現するには染色体 mode と変動の幅を正確に記載することが必要であると述べている

が、癌にみられる核 DNA 量ヒストグラムの変動は正常細胞には認められない大きな特徴であり、重要な指標となり得ると思われる。また、組織学的には扁平上皮癌であっても、このような variation のある変動は、それぞれが互いに異なる細胞遺伝的性格を持つ細胞種族の集合体とも考えられる。

予後はヒストグラムパターンの項で述べるが、明らかに増幅する症例は予後が不良であった。

ヒストグラムパターン分析の着眼点は並数と変動幅を主体とし、並数の $2n$ から $4n$ までの変化と変動幅を組み合わせたものである。並数に関しては前述したように、その病巣の種族細胞としての意味づけであり、並数だけでは無視されるヒストグラムの分散、いわゆる細胞分裂パターンを推測可能と思われる変動幅を加味したものである。並数の度数を加味しなかったのは、細胞増殖にかかわる量的変化より質的变化に重点を置いたためである。また、並数の度数と変動幅は平行関係にあると考えている。

ヒストグラムパターン分析に関しては多数報告^{19,21,22,25,26,28})されているが、一定したものはみあたらない。しかし、傾向としては並数、 $4n$ 以上の細胞数、並数の度数、変動幅などを組み合わせて条件設定しているものがほとんどである。本研究において図13のごとく、4分類したところ、3峰性パターンに peak を有する分布曲線が得られたが、並数が $6n$ 症例、抜歯、切開処置症例、 T_4 症例、組織学的に分化度の低い症例などでは多峰性パターンを示す傾向がみられた。多峰性パターンとは、いわゆる種族細胞の複数化、 S, G_2 期の細胞の異常増殖などが考えられるが、並数が $6n$ の症例については染色体倍加や細胞質不分離といった分裂異常や細胞相互の融合などが生じた結果、high-ploidy な細胞集塊が形成されたのではなからうか。また、このような高値を示す細胞は種族細胞とはなり得ず、脱落していくと考えられている³¹⁾。抜歯、切開処置症例を比較検討した報告はないが、外科的刺激という環境の変化で、それに適応しようとするため、または、それに適した種々の種族細胞が多彩に出現した結果、生じた可能性が考えられる。しかし、外科的処置を施された症例でも単峰性、双峰性パターンがみられたのは抜歯処置13例(40%)、切開処置2例(18%)、外科的複数処置2例(9%)である。これらの症例では外科的処置後来院までの期間が長く、腫瘍の発育が比較的緩慢なため、臨床的には著明な症状を呈さない症例が多くみられた。しかしながら、多峰性を呈する症例では外科的処置後来院までの期間も短く、臨床的に腫瘍の急激な発育のため、症状が増悪した症例がほとんどであった(図27)。 T_4 症例では腫瘍の増殖速度や発癌から来院までの時間的要因などが関与している可能性もあるが、腫瘍が増大するにつれ、細胞増殖分裂形式が多彩に変化するのではなからうか。それは腫瘍細胞集団がモザ

イク構造を呈し³¹⁾、時間の経過とともにその集団から新しい環境に適した細胞が種々選択されたり、淘汰されたりするのではないかと考えられるからである。Levi³²⁾は初期には2倍体のものが進行するにつれ高倍体、異数倍化すると述べ、佐々木ら²¹⁾は表在性胃癌では $2n$ に mode を有するが、深在性になると peak が不分明となり、分散が大きくなると報告している。しかし、臨床的進展度と必ずしも一致しないとの報告⁵³⁾もあるが、本研究では、 T_4 症例に多峰性パターンが多い傾向にあった。癌細胞自体の個体差というものがあるのかも知れないが、多倍体形式は progression の一つの表現型であり、癌が発生してから時間が経つにつれて組織異型が伸展する場合があり、多倍体の付加が量的に進行すること⁵⁴⁾が大きな原因の一つであると考えている。参考までに発症、自覚より来院までの期間と組織学的分化度およびヒストグラムパターンを比較してみると、来院までの期間が長いものに低分化型症例が多くみられる。これは progression の一つの結果なのであろうか(表4)。組織学的に低分化型症例では異数倍体、高倍体細胞の出現率が増加したが、これも諸家の所見^{20,26,27)}と一致している。組織学的に分化度が低いことはその細胞集団が種族細胞説といった特徴のある形態をとらず、個々の細胞が多彩に異常な細胞分裂像を呈し、 S, G_2, M 期の細胞が増加している集団とも考えられる。単峰性パターンに関しては症例も少ないが種族細胞説から考慮すると、比較的単一の種族細胞から成り立っている細胞集団であると考えられる。双峰性パターンは9例で、いずれも組織学的に高分化型であり、次の submode はほぼその並数の2倍を呈しているものが多く、これは一つの mode の細胞集団から clonal evolution³⁴⁾で生じたのか、最初から二つの異なった集団として発生したのかは不明であるが、 $2n$ と $4n$ に peak を持つ細胞増殖パターンはある程度維持されていると考えられるが、本研究では3峰性パターンが150例と多くみられ、 $2n$ から $4n$ の間に3峰性を呈するものが多く、これも最初から三つの異なった集団として発生したのかは断言できないが、次の submode が並数のほぼ2倍付近にある症例も多く、細胞増殖パターンはある程度維持されていると考えられる。

予後は諸家の報告^{19,21,22,25,26,28)}と一致し、多峰性パターンが不良であった。

平均核 DNA 量は代表値であり、並数や変動幅にも左右される値である³³⁾。また、核 DNA 量の量的表現としての意味もある。全症例では $4n$ 付近を peak とする分布がみられた。各予後因子との比較では組織学的に分化度の低い症例や $4n$ 以上の細胞数が50個以上の症例、並数が $6n$ の症例、多峰性症例などでは $5n$ 付近を peak とする傾向がみられた。予後との検討では平均核 DNA 量が多い症例は不良傾向にあり、これも諸家の報告^{55,56)}と一致していた。しかし、明らかな差異がみられなかつ

表 4 組織学的分化度別・自覚より当科来院までの期間区分別ヒストグラムパターンについて

							計
高分化型 (169例)	単峰性	0	0	3	0	4	7
	双峰性	2	7	6	2	7	24
	3 峰性	22	33	21	16	38	130
	多峰性	0	1	3	1	3(例)	8
中分化型 (26例)	単峰性	0	0	0	0	0	0
	双峰性	2	0	0	0	3	5
	3 峰性	0	2	2	1	1	6
	多峰性	3	3	4	0	5(例)	15
低分化型 (30例)	単峰性	0	0	0	1	1	2
	双峰性	0	0	0	0	1	1
	3 峰性	0	3	1	4	4	10
	多峰性	1	7	4	3	2(例)	17
計		30	56	44	28	69(例)	
自覚発症より当科来院までの期間		0～29	30～59	60～87	90～119	120日以上	

たとの報告^{19,57)}もあり、その理由としては核 DNA 量を検討する場合、量的な面からだけの検討であり、その細胞集団の持つ分裂増殖パターンなどが的確に表現できないからではなかろうか。

癌患者の予後を左右する因子が単独ではどのような影響を持つのか、複数の因子が組み合った場合、どのような相関があるのかを定量的に表現することは癌を治療する上で必要かつ意義があるものと思われる。そこで重回帰分析を行った。

癌の予後を左右する因子は多数あると思われるが、本研究において取り上げた因子は図17のごとく、18項目である。これらすべてを用いた重回帰式を求めるのではなく、これらの因子より、さらに選択して、簡単に、最適な重回帰式を作成することであり、その過程で各因子間の相関関係の有無や、予後に作用する因子の重みづけが可能となり、その固有の解釈が容易になると思われる。

変数の選択方法には種々提案されているが、本研究においては逐次選択法のなかの変数増減法²⁹⁾を用いた。変数選択法には一長一短があるが、変数増減法は一度捨てた変数を説明変数の組み合わせ方により、再度代入して検討できる利点があり、説明変数が多い場合などでは最も有効な方法とされている。本研究においても変数選択の基準としてF値が最大値を示し、 $p<0.01$ を満足するものとした。

5年観察期間では10項目、10年観察期間では9項目の説明変数とする最良予測式が得られた。両群に共通する説明変数は性別、T分類、細胞核面積、他病院・開業医での外科的処置であった。重みとしては標準化係数より判定したのであるが、5年観察期間では切開、抜歯処置、

MR療法、T分類では伸展例、舌原発の順に予後不良へ作用する因子がみられた。核 DNA 量に関してはヒストグラムパターンだけが代入されているが、これは並数、変動幅、4n以上の細胞数、並数の度数、組織学的分化度とは互いに相関関係を有し、ヒストグラムパターンを代入した場合、F値が最大値を示したので、それらの代表因子として用いた。ヒストグラムパターンの中では多峰性パターンが予後不良へと作用しているが、前述したように並数の増加、変動幅の増加、4n以上の細胞数の増加、並数の度数の増加、多峰性パターンや組織学的に低分化型症例では予後不良傾向がみられた所見と一致している。このように重回帰分析においては、説明変数同士の相関関係の有無や、各説明変数の重みづけが可能である。さらに、層別変数の場合などでは、各層別内の重みづけも可能であり、核 DNA 量評価としては、ヒストグラムパターン分類が最も的確な項目と思われる。また、切開、抜歯処置例では polyploidy な核 DNA 量の増加がみられたが、重回帰分析においては核 DNA 量評価項目とは相関がみられなかった。この所見は、本来相関関係があるのかもしれないが、これらすべてを含有し、互いに相関関係があり、その代表因子としての立場に位置している可能性もあると思われる。

10年観察期間では5年観察期間に比較して切開、外科的複数処置が予後不良へと作用し、抜歯処置がむしろ予後良好へと働いている。これは retorospective に考えても、切開処置や外科的複数処置の予後が不良の症例が多くみられる(図26)。このような所見で抜歯、切開処置は外科的処置としての層別変数の中で予後良好へと作用する因子と考えた方が良いのかも知れないが、外科的処

置を一つの説明変数と考えた場合、やはり予後不良へと作用していると思われる。さらにTN分類で比較してみると表3のごとく、外科的処置を施されても、無処置群と比較しても臨床的進展度は変化はみられなかった。また、観察期間は10年であるが、予後の不良症例は早期に死亡している症例が多くみられた。このような理由から、5年観察期間では解釈の仕方として、予後不良へ作用する因子を重点的に検討することが癌の治療に対し有意義ではないかと思われる。これに対し、10年観察期間では、むしろ予後良好へと作用する因子を重点的に検討し、さらに長期生存への指標に資することが妥当と考えられる。

核DNA量評価項目は5年観察期間内ではヒストグラムパターンが代表項目になったが、10年観察期間では並数、変動幅を選択した。これは、ヒストグラムパターンとも相関はみられるのだが、10年観察期間においては並数と変動幅を別々に考慮することが望ましいことを示唆しているものと思われるが、いずれにせよヒストグラムパターンが予後を説明するのに重要な因子であり、その細胞分裂パターンが扁平上皮癌の悪性度を表現する最も確かな所見であると思われる。

腫瘍細胞核DNA量およびその細胞分裂パターンが予後に重要な影響を及ぼすことが示唆されたが、特に5年観察期間群の予後因子から予後不良になる要因は抜歯、切開、外科的複数処置などが強く影響していることが明確になった。

結 語

扁平上皮癌細胞核DNA量を測定するにあたり、固定組織よりの細胞分離法を検討し、新しい方法を開発した。この分離法を使用して神戸大学付属病院歯科口腔外科における顎口腔領域の扁平上皮癌細胞核DNA量を測定し、臨床病態および予後との検討を行い、つぎの知見を得た。

1) Collagenase, 2Na-EDTA, 眼科用尖刀の用法を工夫して、扁平上皮癌細胞における良好な細胞分離条件が得られた。

2) aneuploidyな細胞分裂パターンを示す症例は予後不良傾向がみられた。

3) 抜歯、切開、外科的複数処置症例はpolyploidyな核DNA量やaneuploidyな細胞分裂パターンが多くみられ、予後不良であった。

4) 腫瘍の悪性度を的確に表現し得る因子はヒストグラムパターン分類である。

5) 5年および10年観察期間群ではN分類とStage分類に相関がみられたが、T分類とStage分類には明らかな相関はみられなかった。

6) 予後不良と密接に作用する因子は抜歯、切開、外

科的複数処置であった。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜った恩師島田桂吉教授に深く感謝いたします。さらに、本研究にご協力いただいた教室諸先生方に感謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第9回日本頭頸部腫瘍学会(1985年4月20日、東京)、第3回兵庫県歯科医学大会(1985年6月23日、神戸)、第11回日本口腔外科学会近畿地方会(1985年11月30日、大阪)、第25回日本癌治療学会総会(1987年10月9日、札幌)において発表した。

引 用 文 献

- 1) 太田和雄, 野村和弘編集: フローサイトメトリー手技と実際. 初版, 蟹書房, 東京, 1984.
- 2) Shibatani, A. and Naora, H.: Enhancement of color intensity in the histochemical Feulgen reaction, method and quantitative estimation. *Experientia* 8: 268 1952.
- 3) 岩佐善二: 固定組織からの細胞分離法を応用した一新核DNA量顕微分光測定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.
- 4) Takamatsu, T., Nakanishi, K., et al.: Cytofluorometry on Cells Isolated from Paraffin Sections After Blocking of the Background Fluorescence by Azocarmine G. *Histochem* 71: 161-170 1981.
- 5) Matsumura, T., Nitta, K., et al.: Action of Bacterial Neutral Protease on the Dispersion of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Japan J Exp Med* 45: 383-392 1975.
- 6) Frentz, G., Moller, U., et al.: DNA Flow Cytometry on Human Epidermis: I. Methodological Studies on Normal Skin. *J Invest Dermatol* 74: 119-121 1980.
- 7) Parry, J.S., Cleary, B.K., et al.: Ultrasonic Dispersal of Cervical Cell Aggregates. *Acta Cytologica* 15: 163-166 1971.
- 8) Lopez, P.A., Cambier, M.A., et al.: Syringing as a Method of Cell Dispersal. *Anal Quant Cytol* 3: 235-238 1981.
- 9) 坂口龍子, 杉田道夫, 他: Flow-cytometryのための組織細胞分散法の確立. *日臨細誌* 22: 228-234 1983.
- 10) 杉田道夫, 室谷哲弥, 他: 核DNA量分析における新しい組織分散法の応用. *癌の臨床* 28: 1530-1536 1982.
- 11) 柴田偉雄, 他: Autospreadによる検体処理について. *日臨細胞誌* 11: 7-14 1972.
- 12) Sanford, W.C.: A new method for dispersing strongly adhesive cells in tissue culture. *In*

- vitro* 10: 281-283 1974.
- 13) 日本頭頸部腫瘍学会編：臨床・病理頭頸部癌取扱い規約。金原出版，東京，1982.
 - 14) Mendelsohn, M.L., Richards, B.M.: A Comparison of Scanning and Two-Wave length Microspectrophotometry. *Biophysic Biochem Cytol* 4: 707-709 1958.
 - 15) 加藤治文，早田義博：肺扁平上皮癌の発癌過程と DNA 分析—気管支上皮扁平上皮化生，*Carcinoma in situ* 及び角化扁平上皮癌の細胞について，*肺癌* 17: 267-278 1977.
 - 16) 今津和也：核 DNA 量による胃良性悪性疾患の診断基準について—特に細胞診自動化への可能性に関する基礎的臨床的研究— *神大医紀要* 38: 73-92 1978.
 - 17) 藤田忠雄：核 DNA 量よりみた胃癌とその伸展に関する研究。 *神大医紀要* 39: 1-18 1979.
 - 18) 高階正博：MNNG 誘発ラット胃腫瘍に関する病理学的研究—特に Feulgen 核 DNA 量からの検討— *神大医紀要* 39: 491-505 1979.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 佐々木 政，亀川隆久，他：細胞核 DNA 量分布パターン分析による Super 型および Pen 型表在胃癌の臨床的考察。 *医学のあゆみ* 117: 425-428 1981.
 - 22) 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.
 - 23) 井上勝一，宮本 宏，他：ヒト癌細胞の核 DNA 量の側定—顕微分光測光法と Flow cytometry の比較を中心として—。 *日臨細胞誌* 21: 1-7 1982.
 - 24) 佐藤 健，横須賀 薫，他：子宮頸部上皮内癌と微小浸潤癌細胞の核異型と核 DNA 量との関連性。 *日臨細胞誌* 21: 147-153 1982.
 - 25) 佐々木 政，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.
 - 26) 木下靱彦，志村介三，他：口腔病変の臨床的悪性度の指標について。第一報—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—。 *日口外誌* 30: 240-256 1984.
 - 27) 金子忠良：歯肉病変における細胞核 DNA 量の研究—特に歯肉癌とその境界病変について—。 *日口外誌* 31: 1679-1698 1985.
 - 28) 西 律，岡島邦雄，他：乳癌の核 DNA 量に関する研究—ヒストグラムパターンとリンパ節転移との関連について—。 *J Jpn Soc Cancer Ther* 21: 103-107 1986.
 - 29) 奥野忠一，久米 均，他：多変量解析法。第3版，日科技連出版社，東京，1983，1-152頁。
 - 30) Collins, V.P., Loeffler, R.K., et al.: Observations on growth rates of human tumors. *Am J Roentgenol* 76: 988-1000 1956.
 - 31) 草間 悟，高橋 豊：再発癌の時間学。 *消化器外科* 8: 1189-1194 1985.
 - 32) 牧野佐二郎：腫瘍の増殖と染色体，細胞化学シンポジウム，丸善，東京，1960，177頁。
 - 33) 安川正彬：統計学入門基礎編。第27版，日経新聞社，東京，1985.
 - 34) 牧野佐二郎：染色体，人類の細胞遺伝。医学書院，東京，1979.
 - 35) Ising, U., Levan, A.: The chromosomes of two highly malignant human tumors. *Acta Pathol Microbiol Scand* 40: 13 1957.
 - 36) 阿部庄作，井上勝一，他：核 DNA 量による甲状腺腫穿刺細胞診断。 *日臨細胞誌* 20: 8-14 1981.
 - 37) Miyaki, M., Ono, T., et al.: Binding of bleomycin to DNA in bleomycin-sensitive and resistant rat ascites hepatoma cells. *Cancer Res* 35: 2015-2019 1975.
 - 38) 佐藤春郎，井坂英彦，他：がん細胞。中外医学双書，東京，1982，99-118頁。
 - 39) Levan, A., Hauschka, T.S.: Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. *J Natl Cancer Inst* 14: 1-43 1953.
 - 40) 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性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.
 - 41) 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.
 - 42) 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.
 - 43) Atkin, N.B. and Richard, B.M.: Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: A comparison of tumors arising at different sites. *Brit J Cancer* 10: 769-786 1956.
 - 44) Casperson, T.O.: Quantitative Tumor Cytochemistry-G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 39: 2341-2355 1979.
 - 45) Cuvelier, C.A. and Roels, H.J.: Cytophotometric studies of the nuclear DNA content in carcilaginous tumors. *Cancer* 44: 1363-1374 1979.
 - 46) Tavares, A.S., Costa, J., et al: Tumor ploidy and prognosis in carcinomas of the bladder and prostate. *Brit J Cancer* 20: 438-441 1966.
 - 47) 三戸康郎，岡本龍治：DNA 量よりみた胃癌の染色体分析—とくに早期胃癌を中心として— *癌の臨床* 14: 105-113 1968.
 - 48) 三戸康郎，平塚隆三，他：食道癌における脈管侵襲所見の臨床病理学的意義。 *癌の臨床* 25:

- 1287-1292 1979.
- 49) Greisen, O.: Deoxyribonucleic acid content in bronchogenic carcinoma with special reference to polyploid cell nuclei. *Acta Path Microbiol Scand* 77: 177-186 1969.
- 50) Doyle, J.L. and Manhold, J.H.: Feulgen microspectrophotometry of oral cancer and Leukoplakia. *J. Dent Res* 54: 1196-1199 1975.
- 51) Hauschka, T.S.: Method of Conditioning the graft in tumor transplantation. *J Natl Cancer Inst* 14: 723-740 1953.
- 52) Levi, P.E., Cooper, E.H., et al.: Analysis of DNA Content, nuclear size and cell proliferation of transitional cell carcinoma in man. *Cancer* 23: 1074-1085 1969.
- 53) 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.
- 54) 服部隆則: 現代病理学大系 9 A (飯島宗一, 石川栄一編), 中山書店, 東京, 1985, 298頁.
- 55) Fu, Y.S., Reagan, J.W., et al.: Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 49: 2571-2577 1982.
- 56) Atkin, N.B. and Kay, R.: Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors, based on 1465 cases. *Brit J Cancer* 40: 210-221 1979.
- 57) 木村 裕: 口腔領域病変の核 DNA 量による分析. *日口外誌* 31: 189-206 1985.
-