シンポジウム

口腔癌の核 DNA 量に基づく悪性度診断

野 口 誠¹⁾ 金 城 尚 典¹⁾ 仲 盛 健 治²⁾
久 保 田 裕 美¹⁾ 木 戸 幸 恵¹⁾ 竹 村 佳 奈 子¹⁾
宮 崎 晃 亘¹⁾ 小 浜 源 郁¹⁾

要旨: 口腔扁平上皮癌における核 DNA 量の予後因子としての意義を検討した。イメージサイトメトリーを用いて、197 例の口腔扁平上皮癌の生検組織のパラフィン包埋切片における腫瘍発育先進部の癌細胞の核 DNA 量を測定した。得られた DNA ヒストグラムの評価として、超 4c 率 (4c を越える癌細胞の比率) を用いた。

197 例の超 4c 率は最低値 0 から最高値 51% にわたり、中央値は 9.7% であった。各種臨床病理組織所見との関連をみると、癌の進展と悪性度との関連がみられた。全症例の 5 年累積生存率は 75% で、超 4c 率 9.7% 未満群: 90%, 超 4c 率 9.7% 以上群: 60% であった。癌浸潤様式 (山本・小浜分類) の各モードごとに超 4c 率と生存率との関係を見ると、モード 1 および 2 を除き、超 4c 率が低値の群で良好な傾向がみられたが、推計学的に有意差がみられたのはモード 3 のみであった。そこで、モード 3 のみを対象に予後因子の多変量解析を行ったところ、超 4c 率が最も独立性の高い因子であった。

以上より、超 4c 率は有用な口腔癌の予後因子となり得ることが示唆された。

キーワード: 口腔扁平上皮癌, 核 DNA 量, 予後因子

緒 言

癌細胞の核 DNA 量の測定から得られる DNA ヒストグラムは、染色体数の異常、細胞集団の ploidy ならびに増殖動態を表すとされている^{1,2)}。口腔癌における予後との関連は、DNA diploidy の症例の成績が DNA aneuploidy より良好であるとする報告が多く、予後因子になり得ることが示唆されている³⁻⁵⁾。

癌細胞の核 DNA 量の測定法には、瞬時に大量の細胞の測定が可能であるという利点から、flow cytometry (FCM) が広く用いられている。しかしながら、FCM による細胞核 DNA 量の測定は、癌組織に混在する非癌細胞の割合によって、誤った解析結果が得られる可能性が指摘されている^{6,7)}。仲盛ら⁸⁾は、口腔扁平上皮癌組織の核 DNA 量を FCM と cytophotometry (CPM) による測定結果を比較検討し、FCM では DNA diploidy を示す症例のなかに、CPM によって、DNA aneuploidy が示唆される高 DNA 量を有する細胞集団からなる症例が含まれていることを示した。このことから、著者らは口腔癌の核 DNA 量の測定に際して、従来の CPM をコンピューター化した image cytophotometry (ICPM) を用い臨床応用している⁹⁾。

測定結果の評価法には、得られたヒストグラムの形状か

ら DNA ploidy を判定する方法と核 DNA 量の定量的判定法がある。仲盛ら¹⁰⁾は、後者の方がより客観的判定となると考え、4c を越える核 DNA 量を有する細胞の割合 (超 4c 率) を求め治療成績との関連を検討し、口腔癌の予後因子としての有用性を示唆した。本研究では、さらに検討症例を増し、口腔癌の悪性度診断における核 DNA 量 (超 4c 率) 測定の有用性を追求することを目的とした。

対象および方法

対象症例は、札幌医科大学付属病院歯科口腔外科で外科療法によって加療した 197 例の口腔癌とした。原発部位の内訳は、舌: 126 例、口底: 36 例、歯肉: 23 例、頬粘膜: 12 例である。病期分類 (UICC, 1997 年、なお、下顎歯肉癌 T4 の解釈は下顎管分類に従う) は、I 期: 33 例、II 期: 67 例、III 期: 44 例、IV 期: 53 例である。

治療法の内訳は、外科単独: 9 例、術前療法後根治手術: 188 例である。術前療法の内訳は BLM または CDDP との複合化学療法: 176 例、化学放射線療法: 12 例である。

生検法は摘除生検: 9 例、切除生検: 188 例である。切除生検にあたっては、可及的に深部の腫瘍宿主境界部を含むように組織採取を行った。生検組織の HE 染色標本の観察から、分化度ならびに山本、小浜分類¹¹⁾に基づく癌浸潤様式について評価した。

核 DNA 量の測定は、Feulgen 染色を施した 5 μ m の組織切片を用い、SAMBAs 4000 cell image analysis system (IPI 社製) により、一切片あたり 200 から 230 個の

¹⁾ 札幌医科大学医学部口腔外科学講座 (主任: 小浜源郁教授)

²⁾ 琉球大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 砂川 元教授)

〔受付: 2001 年 8 月 9 日, 受理: 2001 年 8 月 27 日〕

図 1 超 4C 率の中央値 (9.7%) でわけた場合の 5 年累積生存率

腫瘍発育先進部の癌細胞を測定した。各切片ごとに、直径 5 から 8 μ m の小リンパ球を 20 個選択、測定し、その平均値を理論的二倍体値 (2c) として内部標準とした。これらのリンパ球の変動係数は 7.6 ± 1.6 (最小 4.9%, 最大 10.8%) であった。以上のように測定した癌細胞の核 DNA 量から、各症例の DNA ヒストグラムを作製した。

DNA ヒストグラムの評価として、仲盛ら¹⁰⁾の報告に基づいて超 4c 率を求め、各種臨床病理学的所見との関連性ならびに口腔癌の予後因子としての意義について検討した。

超 4c 率と各種臨床病理学的所見との関連の検定は、多群間には Kruskal-Wallis 検定、2 群間には Mann-Whitney の U 検定を用いた。5 年累積生存率 (以下、5 生率) は腫瘍死をエンドポイントとした Kaplan-Meier 法により算出し、生存率の比較は log rank test を用いた。また、予後因子の検討は Cox hazard model に基づき、変数選択は stepwise method により行った。統計解析はソフトウェア Stat view 5.0 (SAS Institute Inc.) を用いた。

結 果

1. 超 4c 率と各種臨床病理学的所見との関連

対象 197 例の平均超 4C 率は $12.3 \pm 9.8\%$ で、最低値 0%, 最高値 51.0%, 中央値 9.7% であった。

超 4c 率と原発部位、T 分類、N 分類、発育型、分化度ならびに癌浸潤様式との関連について検討した。原発部位との関連はみられなかった。超 4c 率と T 分類ならびに N 分類との間に関連がみられ、癌の進展にともない高値を示した ($P < 0.005$, $P < 0.001$)。発育型との関連では、外向発育型に比較して内向発育型で高値を示した ($P < 0.0001$)。

病理組織学的所見との関連では、分化度は高分化から低分化になるに従い、癌浸潤様式ではモード 1 からモード 4D になるに従い超 4c 率は高値を示した ($P = 0.0082$,

表 1 核 DNA 量 (超 4c 率) と各種臨床病理学的所見との関係

臨床病理学的所見	症例数	超 4c 率の平均 $\pm$ 1SD (%)	P 値
原発部位			
舌	126	12.7 ± 10.5	
口底	36	12.1 ± 8.4	
歯肉	23	10.5 ± 8.5	0.8419
頬粘膜	12	12.5 ± 8.5	
T 分類			
1	37	8.7 ± 9.9	
2	97	12.7 ± 8.9	
3	25	12.3 ± 8.6	0.0049
4	38	14.9 ± 11.6	
N 分類			
0	113	10.6 ± 8.7	
1	45	12.2 ± 9.8	0.0013
2, 3	39	17.4 ± 11.2	
発育型			
外向	67	8.2 ± 5.7	
内向	130	14.5 ± 10.7	<0.0001
分化度			
高	92	10.1 ± 7.4	
中	80	12.8 ± 10.0	0.0082
低	25	18.7 ± 13.6	
癌浸潤様式			
1	14	6.7 ± 4.9	
2	48	7.8 ± 5.4	
3	82	11.6 ± 8.2	<0.0001
4C	36	17.7 ± 11.6	
4D	17	21.9 ± 13.3	

$P < 0.0001$) (表 1)。

2. 超 4c 率と治療成績との関連

超 4c 率の中央値 (9.7%) で二群に分け、各群の 5 生率を求めたところ、超 4c 率 9.7% 未満群 ($n=97$) は 89.5% と良好であったのに対し、9.7% 以上群 ($n=100$) では 59.5% と不良であった ($P < 0.0001$)。

口腔癌の予後と関連が強い癌浸潤様式と超 4c 率からみた治療成績について検討した (表 2)。各浸潤様式別の症例群を各群の超 4c 率の中央値で二群に分け、5 生率を求めた。癌浸潤様式モード 1 ($n=14$) はいずれも 5 生率 100%, モード 2 ($n=48$) も 90% 以上と良好であった。モード 3 からモード 4D までは超 4c 率の低い群で良好な 5 生率を示す傾向にあったが、推計学的に有意であったのはモード 3 ($n=82$) で、超 4c 率 10% 未満群: 86.9%, 10% 以上群: 64.5% ($P=0.0014$) であった。

そこで、癌浸潤様式モード 3 症例において、超 4c 率が他の臨床病理学的所見を考慮したうえでも独立性の高い予後因子となり得るかについて、Cox hazard model による多変量解析を行った (表 3)。共変量としたのは T 分類 (1, 2+3, 4), N 分類 (0, 1, 2+3), 発育型 (内向型, 外向型), 超 4c 率 (<10%, $\geq 10\%$), 分化度 (高, 中+低) で、こ

表 2 癌浸潤様式と超 4c 率からみた治療成績

	超 4C 率の 中央値	5 年累積生存率 (%)	P 値 (ログランクテスト)
モード 1 (n=14)	6.9	< 6.9 : 100 ≥ 6.9 : 100	—
モード 2 (n=48)	7.4	< 7.4 : 91.7 ≥ 7.4 : 95.0	0.5919
モード 3 (n=82)	10.0	<10.0 : 86.9 ≥10.0 : 64.5	0.0014
モード 4C (n=36)	16.2	<16.2 : 50.2 ≥16.2 : 47.1	0.9753
モード 4D (n=17)	20.3	<20.3 : 50.0 ≥20.3 : 44.4	0.9104

表 3 癌浸潤様式モード 3 の症例 (n=82) における予後因子の多変量解析 (Cox hazard model)

因子	回帰係数	ハザード比 (95%信頼区間)	P 値
超 4c 率 <10.0	—	—	—
≤10.0	1.70	5.49 (1.55-19.49)	0.0084
分化度 高	—	—	—
中, 低	1.22	3.37 (1.08-10.52)	0.0365

のなかで超 4c 率 (P=0.0084) と分化度 (P=0.0365) が独立性の高い因子として選択され有意差を認めた。

考 察

口腔癌の悪性度診断または治療の個別化のための組織学的あるいは生物学的指標が探求され、多くの研究成果が報告されている。臨床研究によって得られた悪性度の指標を臨床応用するためには、用いる指標の客観性と再現性が求められる。

口腔癌の悪性度診断における腫瘍発育先進部の意義に関しては、Yamamoto ら¹¹⁻¹³⁾、Bryne ら¹⁴⁻¹⁶⁾、Bankfalvi ら¹⁶⁾の一連の研究がみられる。いずれの研究成果も、口腔癌組織のなかで腫瘍発育先進部が組織学的あるいは生物学的に個々の腫瘍の特性を反映し、悪性度診断を行う上で極めて有益な情報を提供するとしている。一方、口腔癌の核 DNA 量に関する研究は数多くみられるが、腫瘍発育先進部に着目した研究は極めて少ない。ICPM の利点は、組織切片のなかで測定部位を選択できることと測定細胞を形態学的に選択できることがあげられる。そこで本法を用いて、生検組織における腫瘍発育先進部の癌細胞の核 DNA 量を測定しその意義を検討した。

本研究では DNA ヒストグラムの評価法として、仲盛ら⁹⁾の超 4c 率を用いた。通常、口腔粘膜上皮のような増殖性幹細胞は、非癌状態である限り、二倍体の DNA 量を有する。勿論、測定癌細胞あるいは内部標準としたリンパ球の測定値の deviation を考慮しなければならないので、4c を越える細胞全てが異常とは言えないが、超 4c 率は、概ね正常細胞から逸脱した細胞の割合を反映していると言える。藤田¹⁸⁾による clonal evolution theory に従うと、癌の progression の過程で、二倍体癌細胞の細胞集団の中に、異倍体細胞がサブクローンとして出現し集積してくるとされる。従って、超 4c 率が高値であればあるほど、このような異常細胞からなるサブクロンの存在が強く示唆される。本研究に示されるように、超 4c 率は口腔癌の進展 (T 分類, N 分類) と関連がみられ、前述した仮説を支持する所見と言えるかもしれない。

口腔癌の腫瘍発育先進部における癌浸潤様式は、頸部リンパ節転移頻度、化学療法効果ならびに生命予後と極めて密接に関連することが示されている¹⁹⁻²¹⁾。超 4c 率との関連は両者間に強い正の相関がみられた。各々の癌浸潤様式ごとに、超 4c 率の中央値で症例を二分し治療成績をみた結果では、生存率が極めて良好であったモード 1 およびモード 2 を除き、いずれのモードにおいても超 4c 率が高値の

症例群で予後不良であった。特に、モード3の症例では推計学的に高い有意差がみられたので、他の因子を加え超4c率の予後因子としての独立性を多変量解析によって検定した。その結果、分化度とともに独立性の高い予後因子であることが示された。

以上のことより、腫瘍発育先進部の超4c率は他の病理組織学的所見(分化度、癌浸潤様式)と併せみることで、より確度の高い口腔癌の予後因子となることが示され、臨床応用可能な客観性と再現性のある悪性度の指標となり得ることが示唆された。

結 語

1. 口腔扁平上皮癌 197 例の平均超4c率は $12.3 \pm 9.8\%$ で、最低値 0, 最高値 51.0%, 中央値 9.7% であった。
2. 超4c率と T 分類, N 分類, 発育型, 分化度ならびに癌浸潤様式との間に関連性がみられた。
3. 超4c率の中央値で二群に分けた各群の 5 年累積生存率は、超4c率 9.7% 未満群: 89.5%, 9.7% 以上群: 59.5% であった。
4. 各癌浸潤様式ごとに超4c率の中央値で二群に分け 5 年累積生存率をみると、モード3において超4c率が低値を示す群で有意に成績良好であった。
5. モード3 (n=82) のみを対象として、予後因子の多変量解析を行った結果、共変量とした T, N, 発育型, 分化度ならびに超4c率のなかで、超4c率と分化度が有意であった。
6. 以上より、超4c率は病理組織学的所見と併せみることで、より確度の高い予後因子となり得ることが示唆された。

参考文献

- 1) Peterson, S.E., Freidrich, U.: A comparison between flow cytometric ploidy investigation and chromosome analysis of 32 human colorectal tumors. *Cytometry* 7: 307-312, 1986.
- 2) Remvikos, Y., Gerbault-Seureau, M., et al.: Relevance of DNA ploidy as a measure of genetic deviation. A comparison of flow cytometry and cytogenetics in 25 cases of human breast cancer. *Cytometry* 9: 612-618, 1988.
- 3) Stickle-Santanello, B.J., Farrar, W.B., et al.: Flow cytometric analysis of DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the tongue. *Am J surg* 152: 393-395, 1986.
- 4) Beltrami, C.A., Desinan, L., et al.: Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Path. Res. Pract.* 188: 510-516, 1992.
- 5) Rubio, P., Naval, L., 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.
- 6) 安田範夫, 福島龍之, 他: フローサイトメトリーによる DNA ploidy 解析の問題点—混入単核球の影響について—. *癌と化学療法* 20: 726-730, 1993.
- 7) Lampe, H.B., Lapointe, H., et al.: Whole cell preparation of squamous cell carcinoma for cytometric analysis of DNA. *Otolaryngol Head Neck Surg* 103: 72-79, 1990.
- 8) 仲盛健治, 野口 誠, 他: 口腔扁平上皮癌における細胞核 DNA 量解析—Flow cytometry 法と Cytophotometry 法の比較—. *日口外誌* 44: 617-624, 1998.
- 9) 金城尚典, 野口 誠, 小浜源郁: 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.
- 10) 仲盛健治, 野口 誠, 他: 口腔扁平上皮癌の核 DNA 量測定の臨床的意義—癌浸潤様式別の超4c率について—. *札幌医誌* 64: 65-75, 1995.
- 11) Yamamoto, E., Kohama, G., et al.: Mode of invasion, Bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 51: 2175-2180, 1983.
- 12) Yamamoto, E., Sunakawa, H., et al.: Clinical course of diffuse invasive carcinoma of the tongue excised after Bleomycin treatment. *J. Max.-fac. Surg.* 11: 296-274, 1983.
- 13) Yamamoto, E., Miyakawa, A., et al.: Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg* 6: 938-947, 1984.
- 14) Bryne, M., Koppang, H.S., et al.: Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 166: 375-381, 1992.
- 15) Bryne, M., Jenssen, N., et al.: Histological grading in the deep invasive front of T1 and t2 glottic squamous cell carcinoma has high prognostic value. *Virchows Arcch* 427: 277-281, 1995.
- 16) Bryne, M., Boysen, M., et al.: The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognostication? *Anticancer Res* 18: 4757-4764, 1998.
- 17) Bankfalvi, A., Piffko, J.: Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 29: 291-298, 2000.
- 18) 藤田哲也, 杉原洋行, 他: 癌の他段階進展 (5) 核 DNA 量と ploidy pattern からみた癌の他段階発癌のメカニズム. *臨床科学* 27: 1530-1537, 1991.
- 19) 宮川 明, 小浜源郁, 他: 口腔癌の頸部リンパ節転移に関する臨床病理学的検討—特に腫瘍の浸潤様式との関連について—. *日口外誌* 29: 1555-1561, 1983.
- 20) 木戸幸恵, 野口 誠, 他: 口腔扁平上皮癌の治療期間別の予後因子の解析. *日口外誌* 47: 331-340, 2001.
- 21) 小浜源郁, 野口 誠, 他: 口腔扁平上皮癌の臨床所見と病理組織所見に基づいた外科療法—481 例の分析—. *口腔腫瘍* 13: 33-41, 2001.

Malignancy grading based on nuclear DNA content of oral squamous cell carcinoma

Makoto Noguchi¹⁾, Hisanori Kinjyo¹⁾, Kenji Nakamori²⁾,
Hiromi Kubota¹⁾, Yukie Kido¹⁾, Kanako Takemura¹⁾,
Akihiro Miyazaki¹⁾, Geniku Kohama¹⁾

¹⁾Department of Oral Surgery, Sapporo Medical
University School of Medicine
(Chief : Prof. Geniku Kohama)

²⁾Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Medicine, University of the Ryukyus
(Chief : Prof. of Hajime Sunakawa)

Abstract

Prognostic significance of nuclear DNA content was examined in oral squamous cell carcinoma. Using image cytophotometry, nuclear DNA content of cancer cells in the invasive tumor front was selectively measured in paraffin embedded biopsy tissue from 197 oral squamous cell carcinomas. 4c exceeding rate (4cER) was employed as an interpretation of the DNA histogram. The median 4cER for 197 tumors was 9.7% with range from 0 to 51%. In relation to various clinicopathological factors, high 4cER associated with advanced stage and grade. Five year cause specific survival rate was 75% for the whole series; 90% for patients with less than 9.7% of 4cER and 60% for patients with 9.7% or more. In each subgroup of mode of cancer invasion (Yamamoto-Kohama classification) excepting mode-1 and -2, there was a trend toward enhanced survival rate in low 4cER. This tendency was statistically significance only in mode-3. Furthermore, 4cER was the most powerful prognostic indicator in a multivariate analysis for patients with mode-3.

From these results, it was suggested that 4cER serves as useful prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma.

Key words : oral squamous cell carcinoma, nuclear DNA content, prognostic indicator

Requests for reprints to: Dr. Noguchi M. Department of Oral Surgery School of Medicine, S-1, W-16, Chuo-ku, Sapporo, 060-8543 Japan