

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

金城 尚典 野口 誠 小浜 源 郁

札幌医科大学医学部口腔外科学講座 (主任: 小浜源郁教授)

Image analysis of nuclear DNA content for assessment of effects of preoperative chemotherapy on oral squamous cell carcinoma

Hisanori KINJYOU, Makoto NOGUCHI and Geniku KOHAMA
Department of Oral Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief: Prof. Geniku KOHAMA)

ABSTRACT To elucidate the clinical significance of effects of preoperative chemotherapy on cell kinetics, the changes in mean DNA content and mitotic index (MI) after chemotherapy were examined by image analysis in 103 cases with oral squamous cell carcinoma, and were associated with clinical outcome. In relation to the patients' survival, after the whole series had been classified into cases having a rate of cells exceeding 4c nuclear DNA content of less than 10% (Group A: n=48) and those with a rate of over 10% (Group B: n=55), the relationship between the effects of preoperative chemotherapy and the survival data was investigated.

According to the changes in mean DNA content and MI after chemotherapy, Group A was classified into two groups: i, decrease in both parameters (n=29); ii, increase in mean DNA content and decreased MI (n=19).

On the other hand, Group B was classified into four groups: i (n=23) and ii (n=15) classified according to the same criteria as groups i and ii in Group A respectively; iii, increase in both parameters (n=6); iv, no change in mean DNA content and decreased MI or no change (n=11).

Regarding patients' survival, Group A had good survival rates with favorable changes of cell kinetics (93.1% for group i and 94.7% for group ii). The groups within Group B, determined according to chemotherapeutic effect on cell kinetics, had different survival rates. The survival rates of group i and ii were better than those of group iii and iv (73.7% for group i, 77.1% for group ii, 0% for group iii and 45.5% for group iv).

From these results, it appears that image analysis of nuclear DNA content in combination with MI is useful for assessment of the effects of preoperative chemotherapy on cancer cell kinetics. This type of analysis may serve as a diagnostic aid for predicting patients' survival and selecting the suitable adjuvant therapy for individual patients with oral squamous cell carcinoma.

(Received November 4, 1999 and accepted February 23, 2000)

Key words: Image analysis, Preoperative chemotherapy, Nuclear DNA content, Mitotic index, Oral squamous cell carcinoma

1 緒 言

口腔癌の集学治療の中で術前化学療法は、増殖相に

ある腫瘍細胞の増殖活性を制御し¹⁾ down grading を得ることと腫瘍容積を縮小させ down staging を得ること^{1,2)} から治療成績の向上を図ること³⁾ を目的として行

われる。当教室では口腔癌の外科療法に際して、Bleomycin (BLM) を主体とした術前化学療法を行い、腫瘍縮小効果に関連する因子を臨床病理学的観点から明らかにしてきた⁴⁻⁸⁾。

癌細胞の核 DNA 量の異常は、細胞動態あるいは染色体の異常を反映することから、その解析は癌の生物学的性状を理解する上で重要である⁹⁾。岩井¹⁰⁾ は口腔癌の術前化学療法前の DNA ヒストグラムの形状から、分散幅の狭域な症例は BLM による術前化学療法に感受性を示すことを報告した。さらに熊谷ら¹¹⁾ は細胞動態の面から解析を加え、術前化学療法に有効な症例の多くは非増殖相の占める割合が高い高分化癌であることを明らかにした。

一方、術前化学療法による細胞動態の制御からみた効果を検討することは、根治手術の予後あるいは後療法の選択に資するところが大きいと考えられるが、このような観点からの報告は乏しい¹²⁻¹⁴⁾。

本研究は、口腔癌の DNA ヒストグラム上の 4c を超える細胞の割合 (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¹⁵⁾ の報告に基づき、対象症例を超 4c 率 10% 未満群と 10% 以上群に分けた上で、各々の群における術前化学療法による細胞動態の制御からみた効果とその臨床的意義を明らかにすることを目的とした。すなわち、術前化学療法前後の核 DNA 量の変化値と臨床効果ならびに根治手術後の治療成績との関連を明らかにし、その臨床的意義について検討した。

2 対象および方法

2.1 研究対象

1984 年 4 月より 1997 年 3 月までの間に、札幌医科大学医学部附属病院歯科口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌一次症例 (手術症例) 284 例のうち、術前化学療法を行い術後 2 年以上経過観察した 103 例を研究対象とした。なお、術前に動注化学療法、放射線照射を併用した症例は除外した。対象症例の臨床病理学的所見の内訳を Table 1 に示す。術前化学療法は CDDP (60-80 mg 静注) 単独投与: 12 例, BLM (60-90 mg 静注) 単独投与: 13 例, CDDP (60-80 mg 静注) または CBDCA (200-400 mg 静注) に BLM (60-90 mg 静注) または PEP (25-50 mg 静注) を加えた多剤併用投与: 78 例であった。各群での奏効率率は、頭頸部癌取扱規規約第 2 版に基づいた治療効果判定基準の方法に準じて腫瘍縮小率¹⁶⁾ を算出したが、違いを認めなかったため各群合わせて検討した。

2.2 研究方法

2.2.1 組織標本の作製

術前化学療法前の生検組織と術前化学療法後の手術切除組織を中性ホルマリン固定・パラフィン包埋した後、厚さ 5 μ m の連続切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (H・E) 染色ならびに Guidozzi et al.¹⁷⁾ の報告に準じて Feulgen 染色を施した。

2.2.2 核 DNA 量の測定法

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 (Imaging Products International, SAMBA[®]4000 Cell Image Analysis System) を用いて、仲盛ら¹⁵⁾ の報告に準じ測定した。内部標準としたリンパ球の変動係数 (coefficient of variation: CV 値)¹⁸⁾ は最小 3.6%~最大 10.8% で、平均値は 7.6 \pm 1.6% であった。

2.2.3 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の超 4c 率および術前化学療法前後の平均 DNA 量¹⁹⁾ 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 DNA 量の値は便宜的に 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平均 DNA 量の CV 値が最小 1.8 から最大

Table 1 Clinicopathological characteristics of 103 cases with oral squamous cell carcinoma.

Clinicopathological findings	No. of cases (n=103)
Site	
tongue	60
floor of mouth	26
gingiva	9
buccal mucosa	8
*T-category	
T1	20
T2	49
T3	18
T4	16
*Clinical stage	
I	17
II	34
III	27
IVA	25
*Histopathological Grading	
G1	53
G2	40
G3	10
**Mode of invasion	
1	5
2	31
3	43
4C	16
4D	8

*UICC, 1997

**Yamamoto & Kohama, 1983

4.8にわたっていたので、術前化学療法前後の変化が5%未満のものは便宜的に「変化なし」とした。

2・2・4 分裂細胞指数 (Mitotic index: MI) の算出
癌細胞の増殖能の指標として分裂細胞指数 (Mitotic index: MI) を求めた。測定対象細胞は核 DNA 量を測定した部位を含めた癌細胞 1000 個とし、これに含まれる分裂細胞の比率 (%) として算出した¹¹⁾。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 17.0 にわたっていたので、術前化学療法前後の変化が 20% 未満のものは便宜的に「変化なし」とした。

2・2・5 術前化学療法の臨床効果判定

術前化学療法による臨床効果の判定は、術前化学療法終了時における腫瘍の二方向測定により腫瘍縮小率¹⁰⁾を求めた。

2・2・6 統計処理

術前化学療法前後の平均 DNA 量および MI の平均値の差の検定は Wilcoxon signed-rank test を用いた。腫瘍縮小率の平均値の差の検定には Mann-Whitney の U 検定を用いた。治療成績の評価は Kaplan-Meier 法により 5 年累積生存率を算定し、生存率の差の検定には Logrank test を行った。これらの検定結果は $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

3 結 果

3・1 生検組織における超 4c 率

対象 103 例の生検組織における超 4c 率は 1.4% から 42.6% にわたり、その平均値は $12.5 \pm 8.3\%$ であった。また仲盛ら¹⁵⁾の報告に従い、超 4c 率 10% 未満群 (A 群) と 10% 以上群 (B 群) に大別すると、それぞれ 48 例、55 例であった。

3・2 術前化学療法前後の平均 DNA 量

術前化学療法前後の平均 DNA 量の変化を症例ごとにプロットしたものを Fig. 1 に示す。

3・2・1 超 4c 率 10% 未満群 (A 群 n=48)

全ての症例で術前化学療法後に平均 DNA 量は変化していた。術前化学療法前の平均 DNA 量は最低 2.01~最高 2.89 にわたり平均値は 2.47 ± 0.18 で、術前化学療法後は最低 0~最高 4.02 にわたり平均値は 2.09 ± 1.2 であった。術前化学療法前後での平均 DNA 量の変化をみると、29/48 例 (60.4%) で減少し、19/48 例 (39.6%) で増加した。

3・2・2 超 4c 率 10% 以上群 (B 群 n=55)

術前化学療法前の平均 DNA 量は最低 2.42~最高 4.1 にわたり平均値は 3.02 ± 0.37 で、術前化学療法後は最低 0~最高 4.21 にわたり平均値は 2.76 ± 0.86 であった。術前化学療法前後での平均 DNA 量の変化をみると、23/55 例 (41.8%) で減少、21/55 例 (38.2%) で増加し、11/55 例 (20.0%) で変化を認めなかった。

3・3 術前化学療法前後の MI

術前化学療法前後の平均 DNA 量の変化別にみた MI の変化を検討した (Fig. 2)。

3・3・1 超 4c 率 10% 未満群 (A 群 n=48)

全ての症例で術前化学療法後に MI は減少していた。

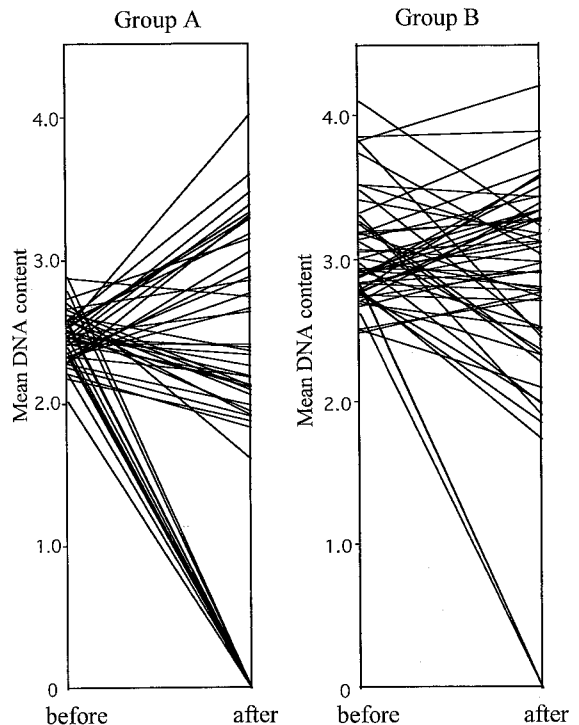


Fig. 1 Mean DNA content before and after chemotherapy.

Group A; cases with DNA content exceeding 4c of less than 10% in biopsy specimen (n=48). In twenty nine of 48 cases, mean DNA content decreased after chemotherapy. In the remaining nineteen cases, it increased after chemotherapy.

Group B; cases with DNA content exceeding 4c of more than 10% in biopsy specimen (n=55). In forty four of 55 cases, mean DNA content decreased in 23 and increased in 21 after chemotherapy. The remaining 11 cases did not change significantly in mean DNA content during chemotherapy.

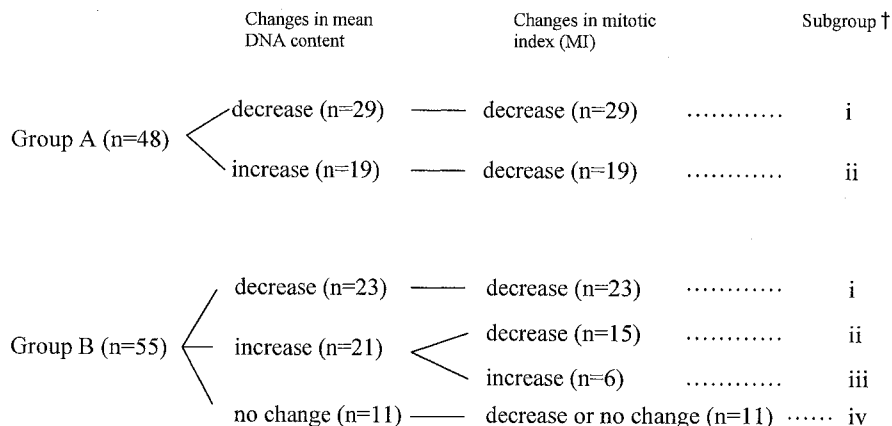


Fig. 2 Changes in mean DNA content and mitotic index (MI) for 103 cases with oral squamous cell carcinoma before and after chemotherapy.

Group A; cases with DNA content exceeding 4c of less than 10% in biopsy specimen.

Group B; cases with DNA content exceeding 4c of more than 10% in biopsy specimen.

† : i; Mean DNA content and MI decreased after chemotherapy. ii; Mean DNA content increased and MI decreased after chemotherapy. iii; Mean DNA content and MI increased after chemotherapy. iv; Mean DNA content did not change and MI decreased or did not change after chemotherapy.

平均 DNA 量が減少した症例 i (29/48 例) では、術前化学療法前の MI の平均値は $0.66 \pm 0.28\%$ であったが、術前化学療法後の MI の平均値は $0.19 \pm 0.25\%$ と有意に減少していた ($p < 0.0001$)。平均 DNA 量の増加した症例 ii (19/48 例) では、術前化学療法前の MI の平均値は $0.91 \pm 0.40\%$ であったが、術前化学療法後の MI の平均値は $0.40 \pm 0.24\%$ と有意に減少していた ($p = 0.0002$)。

3・3・2 超 4c 率 10%以上群 (B 群 n=55)

平均 DNA 量が減少した症例 (23/55 例) では、術前化学療法前の MI の平均値は $1.06 \pm 0.40\%$ であったが、術前化学療法後には MI の平均値は $0.52 \pm 0.35\%$ と、有意に減少していた ($p < 0.0001$)。

平均 DNA 量が増加した症例 (21/55 例) では、術前化学療法後 MI が減少した症例は 15/21 例で、MI が増加した症例は 6/21 例であった。この内、MI が減少した 15 例の術前化学療法前の MI の平均値は $0.96 \pm 0.36\%$ であったが、術前化学療法後の MI の平均値は $0.46 \pm 0.28\%$ と有意に減少していた ($p = 0.001$)。一方、MI が増加した 6 例の術前化学療法前の MI の平均値は $0.81 \pm 0.32\%$ で、術前化学療法後の MI の平均値は $1.16 \pm 0.38\%$ と有意に増加していた ($p < 0.05$)。

平均 DNA 量に変化を認めなかった症例 (11/55 例) では、術前化学療法前の MI の平均値は $1.15 \pm 0.40\%$ で、術前化学療法後の MI の平均値は $0.79 \pm 0.26\%$ であり、有意に減少していたが ($p < 0.05$)、平均 DNA 量

が減少した症例や平均 DNA 量が増加し MI が減少した症例に比べ、その変化の割合は少なかった。

以上の結果を Fig. 2 に示す。B 群における平均 DNA 量が増加した症例のなかには、MI も増加した症例が 6 例みられ、これらは MI が減少した症例とは別に検討を行った。すなわち、細胞動態の変化から術前化学療法効果を以下の i, ii, iii, iv 亜群に分類した。i; 術前化学療法後平均 DNA 量, MI がともに減少, ii; 術前化学療法後平均 DNA 量が増加し, MI が減少, iii; 術前化学療法後平均 DNA 量, MI ともに増加, iv; 術前化学療法前後で平均 DNA 量に変化がなく MI が減少あるいは変化なしの 4 亜群とした。さらに Fig. 3~5 に i, ii, iii の代表例を示す。術前化学療法後平均 DNA 量が減少した症例は DNA ヒストグラムの左方移動がみられ、増加した症例では DNA ヒストグラムの右方移動がみられた。

3・4 細胞動態の変化からみた術前化学療法効果別の腫瘍縮小率

A 群, B 群に分けて細胞動態の変化に基づく術前化学療法効果別に腫瘍縮小率をプロットしたものを Fig. 6 に示す。A 群では、i: $72.5 \pm 18.1\%$, ii: $59.1 \pm 19.7\%$ で、i は ii に比べ腫瘍縮小効果は有意に高値であった ($p < 0.05$)。B 群では、i: $54.8 \pm 24.2\%$, ii: $57.1 \pm 16.6\%$, iii: $39.0 \pm 18.0\%$, iv: $42.9 \pm 22.3\%$ であり、有意差は認められないものの A 群, B 群、共に i, ii の腫瘍縮小率が高い傾向であった。

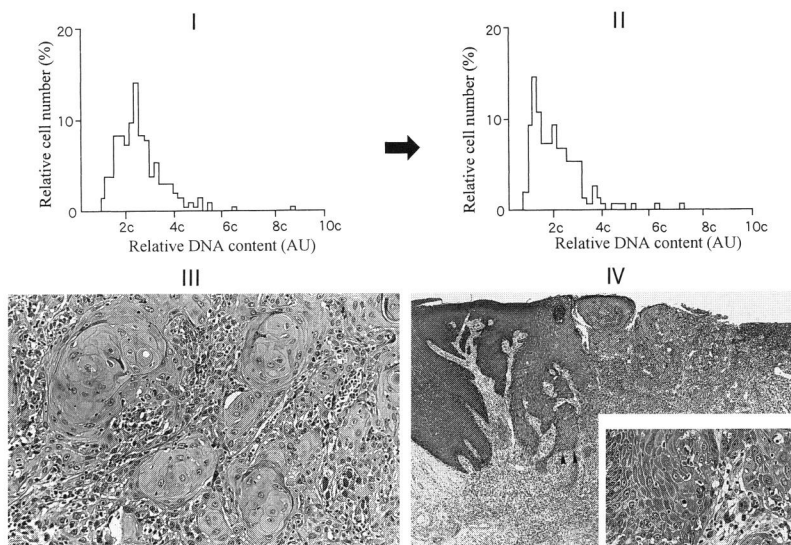


Fig. 3 A representative case with DNA histogram showing a shift towards left after chemotherapy. I; DNA histogram before chemotherapy. II; DNA histogram after chemotherapy. DNA histogram shifted to the left after chemotherapy: mean DNA content before chemotherapy, 2.59, after chemotherapy, 2.06; MI before chemotherapy, 1.06, after chemotherapy, 0. III; Biopsy specimen before chemotherapy. The tumor shows moderate differentiation, moderate cellular atypism, some nuclear mitoses and slight stromal lymphocyte reaction (H.E, original magnification $\times 200$). IV; Surgical specimen resected after chemotherapy (H.E, original magnification $\times 40$). The tumor cells localize in the superficial portion. Inset shows a higher magnification view of the arrowed portion (H.E, original magnification $\times 200$). Inner layer consist of differentiated or necrotic cells.

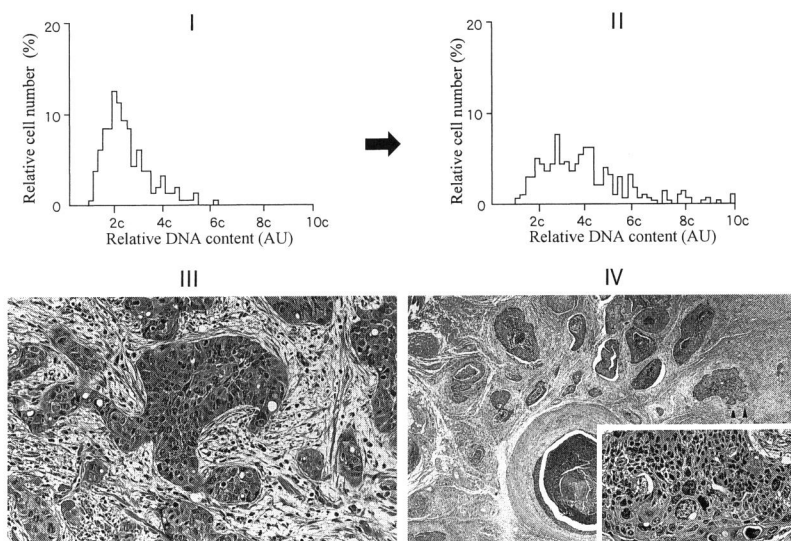


Fig. 4 A representative case with DNA histogram showing a shift towards right after chemotherapy. I; DNA histogram before chemotherapy. II; DNA histogram after chemotherapy. DNA histogram shifted to the right after chemotherapy: mean DNA content before chemotherapy, 2.53, after chemotherapy, 4.02; MI before chemotherapy, 1.36, after chemotherapy, 0.48. III; Biopsy specimen before chemotherapy. The tumor shows well differentiation, moderate cellular atypism, numerous nuclear mitoses and slight stromal lymphocyte reaction (H.E, original magnification $\times 200$). IV; Surgical specimen resected after chemotherapy (H.E, original magnification $\times 20$). The tumor cells are distributed from the superficial to the deep portion. Inset shows a higher magnification view of the arrowed portion (H.E, original magnification $\times 200$). Markedly swollen tumor cells are shown in tumor nests.

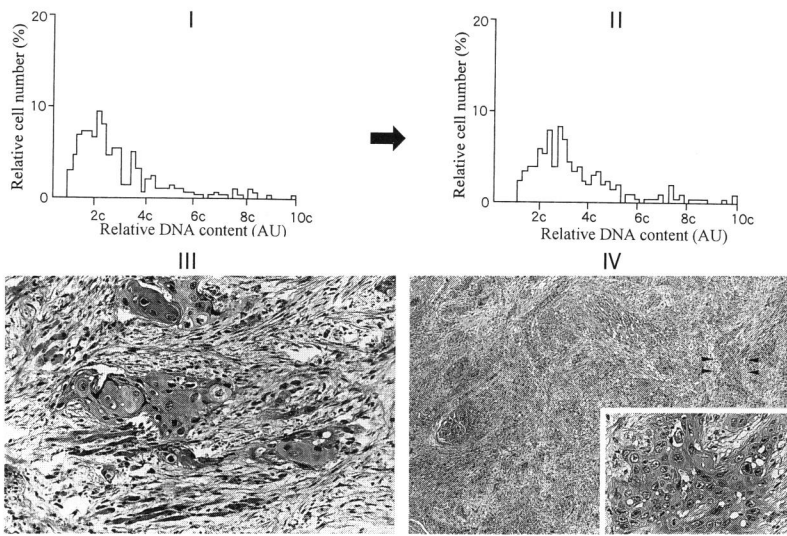


Fig. 5 A representative case with DNA histogram showing a shift towards right and increased mitotic index after chemotherapy.

I; DNA histogram before chemotherapy. II; DNA histogram after chemotherapy. DNA histogram shifted to the right and increased mitotic index after chemotherapy: mean DNA content before chemotherapy, 2.77, after chemotherapy, 3.34; MI before chemotherapy, 0.8, after chemotherapy, 1.46. III; Biopsy specimen before chemotherapy. The tumor shows moderate differentiation, moderate cellular atypism, some nuclear mitoses and slight stromal lymphocyte reaction (H.E, original magnification $\times 200$). IV; Surgical specimen resected after chemotherapy (H.E, original magnification $\times 40$). The tumor cells localize in the comparatively deep portion of the muscle layer. Inset shows a higher magnification view of the arrowed portion (H.E, original magnification $\times 200$). The tumor cell has marked cellular atypism and some mitoses are shown.

3・5 超 4c 率および細胞動態の変化からみた術前化学療法効果別の治療成績

A 群と B 群に分けて治療成績を検索した結果を Fig. 7 に示す。A 群では、i: 93.1%, ii: 94.7% で、治療成績は良好であった。B 群では、i: 73.7%, ii: 77.1%, iii: 0%, iv: 45.5% であった。これらは DNA ヒストグラムが左方移動あるいは右方移動し、かつ MI が減少した場合は治療成績も有意に良好であった ($p < 0.001$)。

4 考 察

口腔癌の化学療法の組織学的効果の判定は、切除組織標本での残存癌細胞の量的割合と形態学的変化^{19,20}の所見に基づいて行われている。しかし、その効果判定は主観的であることもあって治療成績を必ずしも反映しないことをしばしば経験する。そこで、われわれは化学療法による定量的効果判定法を確立する目的で化学療法前後の癌細胞の核 DNA 量を測定した。

核 DNA 量の解析についての報告は数多く行われているが^{21,22}、いずれの報告も化学療法効果の予測性に主眼がおかれ、化学療法前後の核 DNA 量の変化の所見から化学療法効果を検討した報告は少なく^{12,13}、特に核

DNA 量と MI の両面から検討した報告はみられない。そこで著者らは術前化学療法効果を核 DNA 量と MI の変化値から判定することは臨床的意義が大きいと考え本研究を行った。

4・1 細胞動態の変化に基づく術前化学療法効果の判定

細胞動態の変化に基づく術前化学療法効果を検討した結果、術前化学療法後に平均 DNA 量が減少し DNA ヒストグラムが左方移動した症例は 52/103 例 (50.5%) であった。これらの症例では術前化学療法後に低 2c の細胞集団の増加を観察しえた。このような症例の細胞動態の変化を考察すると、cell cycle の増殖相にある細胞は制癌剤により DNA degradation をきたし、細胞死あるいは変性壊死に向かう細胞が増加したため、DNA ヒストグラムが相対的に左方へ移動したと考えた。いくつかの培養細胞を用いた研究^{23,24}で示されたように、2c に満たない細胞集団の出現はアポトーシスを生じているといわれているが、本研究ではこれらの細胞集団がアポトーシスであるのか否かの検討は行わなかった。いずれにしても、こうした細胞集団は、のちに死滅する細胞とみなされること、また全例 MI が減少しており臨床的にも良好な腫瘍縮小効果が得られ

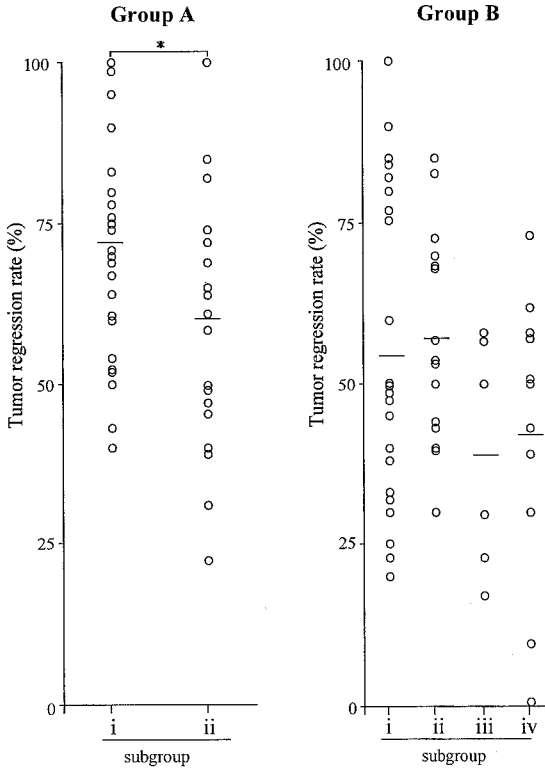


Fig. 6 Relationship between tumor regression rates and chemotherapeutic effects on cell kinetics. In Group A, tumor regression rate of group i was significantly better than that of group ii (72.5±18.1% VS. 59.1±19.7%, *: p<0.05). In Group B, tumor regression rates were 54.8±24.2% for group i, 57.1±16.6% for group ii, 39.0±18.0% for group iii and 42.9±22.3% for group iv. Groups i and ii had good response, but groups iii and iv had poor response.

ていることから、術前化学療法後 DNA ヒストグラムの左方移動は良好な術前化学療法効果を示す所見であると考えている。

術前化学療法後に平均 DNA 量が増加し、DNA ヒストグラムが右方移動した症例は 40/103 例 (38.8%) であった。Welkoborsky et al.¹³⁾ は頭頸部癌症例の術前化学療法において術前化学療法後の効果不良例では、核 DNA 量が増加することを報告した。本研究において、平均 DNA 量の増加を示した 40 例の内、34 例は術前化学療法後に MI が減少していた。制癌剤の細胞周期への影響と形態学的な変化に関する報告では、S~G₂ 期細胞の増加に伴い核の腫大と分裂細胞の減少がみられることから腫大した細胞は M 期へ移行できない S~G₂ 期の細胞²⁵⁾、あるいは多倍体化した細胞²⁶⁾ であるといわ

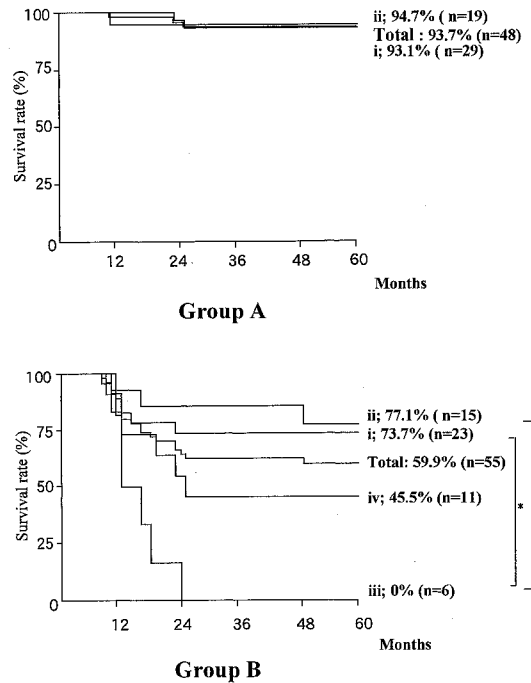


Fig. 7 Five-year cumulative survival rates by chemotherapeutic effects on cell kinetics. There was no significant difference in survival rate between the groups in Group A (n=48). On the other hand, in Group B (n=55), the survival rates of group i and group ii were significantly better than those of group iii (*: p<0.001, Logrank Test).

れている。したがって、平均 DNA 量が増加したものの内、MI が減少した症例では制癌剤による S~G₂ 期の細胞蓄積と考え、のちに mitotic death²³⁾ や M 期に移行することなくアポトーシスを生じ死滅した結果^{24,27,28)}、縮小効果が得られた可能性が推測でき、良好な術前化学療法効果であることを示唆している。

平均 DNA 量に変化がなかったと判定した症例は 11/103 例 (10.7%) であった。この 11 例の術前化学療法後の MI の減少はわずかであったことから、増殖動態は制御されなかったと考えた。さらに平均 DNA 量が増加した症例の内、MI が増加した 6 例については、腫瘍縮小効果は不良で、増殖動態が制御されている DNA ヒストグラムの右方移動とは異なり、術前化学療法による増殖動態の制御が得られず、制癌剤に抵抗性を示す最も予後不良な症例であると推測した。

4.2 超 4c 率 10%未満の腫瘍について

超 4c 率 10%未満の腫瘍は、臨床的には局所に限局した外向性発育を示し、組織学的には分化傾向が高く、

比較的浸潤傾向の弱い特徴を有すると言われている^{15,29)}。また DNA ヒストグラムと³H-thymidine を併用した細胞動態の解析から、腫瘍を構成する細胞集団は遺伝的な不安定性を持った細胞が少なく比較的均一の細胞集団から構成され¹¹⁾、悪性度が低いことを著者らはすでに報告しており^{15,29)}、この観点から治療成績は良好であったと考える(A群 i: 93.1%, A群 ii: 94.7%)。このような悪性度の低い症例の組織学的な化学療法効果は、深部の癌巣から崩壊し残存癌細胞は表層に局限することが知られている⁷⁾。さらに細胞動態の変化に基づく術前化学療法効果からみても、残存癌細胞は平均 DNA 量が減少した症例では、細胞死あるいは変性壊死の過程、また平均 DNA 量が増加した症例では、細胞回転の S~G₂ 期への進行遅延や細胞蓄積で、のちに死滅する細胞とみなされ、良好な術前化学療法効果が得られたことを示している。

4・3 超 4c 率 10%以上の腫瘍について

超 4c 率 10%以上の腫瘍は、臨床的には内向性発育を呈する進展例が多く、組織学的には浸潤傾向の強い特徴を有すると言われている。また、これらの症例は腫瘍の進展に伴い、aneuploid cell や polyploid cell の割合が高くなり、悪性度は高く治療成績は不良であるといわれている^{15,29)}。しかし、細胞動態の変化に基づく術前化学療法効果の判定では、このような悪性度の高い症例のなかでも術前化学療法に感受性を示し、DNA ヒストグラムが左方移動あるいは右方移動し、かつ MI が減少した症例では治療成績は比較的良好であった(B群 i: 73.7%, B群 ii: 77.1%)。

一方、術前化学療法前後で平均 DNA 量に変化がみられなかった症例および DNA ヒストグラムが右方移動し MI が増加した症例では、腫瘍縮小効果は不良で細胞動態の変化からみても、特に後者 6 例では増殖動態の制御を得どころか逆に賦活し up grading をきたしたために、治療成績は極めて不良であったと考える。また、これら 6 例は局所再発、転移をきたした症例で、臨床的には Stage III, IV の進展癌、組織学的には高度浸潤癌(浸潤様式⁴⁾ 4 C 型, 4 D 型)で、極めて制御困難な癌^{4,6,30-32)}であったことも予後不良となった原因と考えた。したがって、これらの症例に対しては新たな感受性のある制癌剤の選択、または他の有効な術前療法の必要があると考えた。

本論文では細胞動態の変化に基づいた術前化学療法効果の判定を行うことで、従来予後不良と考えられていた超 4c 率 10%以上群¹⁵⁾の中にも、術前化学療法に効果を示す症例が存在することと極めて術前化学療法

に抵抗性を示す症例が存在することを明らかにした。以上のことから本法は客観的効果判定法であり、根治手術後の予後あるいは後療法の選択に重要な情報を提供し、臨床的意義が極めて大きいことを示した。

5 要 約

口腔扁平上皮癌 103 例の術前化学療法前後の核 DNA 量を測定し、細胞動態の変化に基づく術前化学療法効果判定法を検討した。さらに超 4c 率 10%未満群(A群)と 10%以上群(B群)に分けて治療成績との関係について検討し以下の結果を得た。

1. 細胞動態の変化に基づいた術前化学療法効果の判定

細胞動態の変化に基づいて術前化学療法効果を検討した結果、A群では i: 術前化学療法後平均 DNA 量, MI がともに減少, ii: 術前化学療法後平均 DNA 量が増加し, MI が減少の 2 亜群に、B群では i, ii のほかに, iii: 術前化学療法後平均 DNA 量, MI がともに増加, iv: 術前化学療法前後で平均 DNA 量に変化がなく MI が減少あるいは変化なしの 4 亜群に分類した。

2. 細胞動態の変化に基づく術前化学療法効果と治療成績

A群での治療成績は、i: 93.1%, ii: 94.7%と良好であった。B群での治療成績は、i: 73.7%, ii: 77.1%, iii: 0%, iv: 45.5%であり、術前化学療法後 DNA ヒストグラムが左方あるいは右方に移動し、かつ MI が減少し増殖動態が制御された症例で治療成績が良好であるのに対し、MI が増加する症例では極めて不良であった ($p < 0.001$)。

以上のことから、術前化学療法前後の核 DNA 量を測定し、細胞動態の変化に基づいて術前化学療法効果を検討することは、より客観的効果判定法であり、根治手術後の予後あるいは後療法の選択に重要な情報を提供し、臨床的意義が極めて大きいことを示した。

参考文献

- 1) 山本悦秀, 砂川 元, 久保四郎, 熊谷茂宏, 古田 勲, 小浜源郁. プレオマイシンの投与により腫瘍が球状に局限化した舌癌の 2 例—特にその成立と関連する因子について—. 日口外会誌 1982, 28: 1748-1754.
- 2) 犬山征夫. 頭頸部癌における Neoadjuvant chemotherapy の現況. *Oncologia* 1991, 24: 9-14.
- 3) Athanasiadis I, Taylor IV S, Vokes EE, Pelzer HJ, Rademaker A, Mittal BB, Ganzenko N, Blough R, Lester EP, Kies MS. Phase II study of induction and adjuvant chemotherapy for

- squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1997, 79: 588-594.
- 4) Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M, Hiratsuka H. Mode of invasion, Bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1983, 51: 2175-2180.
 - 5) 砂川 元, 山本悦秀. 口腔領域の扁平上皮癌に関する臨床病理学的検討—特に Bleomycin 制癌効果の計量的解析—. *札幌医誌* 1983, 52: 531-557.
 - 6) 小浜源郁. 口腔癌の化学療法効果に関する臨床, 病理, 細胞免疫学的研究—特に臨床病理学的悪性度とプレオマイシン効果および予後について—. *日口科会誌* 1984, 33: 672-698.
 - 7) 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. *札幌医誌* 1989, 58: 317-329.
 - 8) Noguchi M, Sekiguchi T, Kido Y, Kinjo H, Ide T, Suda Y, Kohama G. Prognostic Value of response to preoperative chemotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 1999, 11: 47-53.
 - 9) Sugihara H, Hattori T, Fukuda M, Katsura K, Fujita S. Progression of signet ring cell carcinomas in the human stomach. *Cancer* 1993, 71: 1938-1947.
 - 10) 岩井正行. 舌扁平上皮癌の顕微蛍光測光法による核 DNA 量の解析とその臨床的意義. *札幌医誌* 1985, 54: 195-214.
 - 11) 熊谷茂宏, 岩井正行. 口腔扁平上皮癌の細胞動態に関する研究—顕微蛍光測光法と³H-thymidine オートラジオグラフィ—の併用による解析—. *札幌医誌* 1985, 54: 517-530.
 - 12) Hemmer J, Kreidler J, Thein T, Haase S. Monitoring of intra-arterial treatment with epirubicin and cisplatin in oral carcinoma by DNA flow cytometry. *Chemotherapy* 1991, 37: 150-156.
 - 13) Welkoborsky HJ, Mann WJ, Sanal C, Freije JE. DNA measurements for monitoring chemotherapy in advanced head and neck carcinomas. *Head Neck* 1994, 16: 240-245.
 - 14) Kubota K, Kajiuira N, Konishi T, Teruya M, Tsushima H, Nakao K, Arizono S, Oka T, Makuuchi M. Effects of preoperative chemotherapy on DNA ploidy patterns, cell cycle, and histological findings in gastric and colonic cancer patients. *J Surg Oncol* 1994, 57: 222-229.
 - 15) 仲盛健治, 野口 誠, 小浜源郁. 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* 1995, 64: 65-75.
 - 16) 日本頭頸部腫瘍学会編, VIII 治療効果判定基準, 臨床・病理 頭頸部癌取扱い規約. 東京, 金原出版, 1991, 96-100.
 - 17) Guidozzi F, Szunel RC, Ball JHS, Johnston DA, Katz RL, Kidd L. Image analysis of cellular DNA content in peritoneal fluid of patients with ovarian tumors of low malignant potential and invasive epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1996, 61: 204-209.
 - 18) 高本 滋. 測定の実際とトラブルの解決法. 大田和雄監修. 野村和弘, 高本 滋 編. フロサイトメトリー—手技と実際—. 東京, 蟹書房, 1988, 139-146.
 - 19) 下里幸雄. 病理形態からみた癌化学療法の効果判定とその問題点. *医学のあゆみ* 1987, 141: 612-616.
 - 20) Osaki T, Hirota J, Yoyeda K, Yamamoto T, Ueta E. Distribution of surviving tumor cells after chemoradiotherapy in tongue and floor of mouth carcinomas. *Head Neck* 1994, 16: 218-226.
 - 21) Campbell BH, Schemmel JC, Hopwood LE, Hoffmann RG. Flow cytometric evaluation of chemosensitive and chemoresistant head and neck tumors. *Am J Surg* 1990, 160: 424-426.
 - 22) Tennvall J, Wennerberg J, Anderson H, Baldeurop B, Fernö M, Willén R. DNA analysis as a predictor of the outcome of induction chemotherapy in advanced head and neck carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993, 119: 867-870.
 - 23) Tounekti O, Pron G, Belehradek J Jr, Mir LM. Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res* 1993, 53: 5462-5469.
 - 24) Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 1990, 82: 749-755.
 - 25) 伊藤正美, 井上勝一, 荒谷義和, 高岡和夫, 宮本宏, 川上義和, 水野重孝. ヒト肺癌培養細胞における cis-diamminedichloroplatinum (II) の Cell Kinetics の研究. *日癌治療会誌* 1986, 21: 2206-2215.
 - 26) 馬杉美和子, 小西英一, 上田和茂, 安住有史, 芦原司. Peplomycin による G₂ ブロック細胞の増殖動態追跡. *癌と化学療法* 1994, 21: 683-688.
 - 27) Arita D, Kambe M, Ishioka C, Kanamaru R. Induction of p53-independent apoptosis associated with G₂M arrest following DNA damage in human colon cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1997, 88: 39-43.
 - 28) Yamane N, Makino M, Kaibara N. S-phase accumulation precedes apoptosis induced by

- preoperative treatment with 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cells. *Cancer* 1999, 85: 309-317.
- 29) 野口 誠, 金城尚典, 小浜源郁. 口腔扁平上皮癌の癌浸潤様式と核 DNA 量に基づく悪性度診断と治療へのフィードバック. *頭頸部腫瘍* 1997, 23: 691-697.
- 30) 小浜源郁. 舌癌一診断と外科療法. *日口外会誌* 1989, 35: 1710-1714.
- 31) 山本悦秀, 砂川 元, 小浜源郁. び慢性浸潤型口腔扁平上皮癌に関する研究. *日口外会誌* 1982, 28: 1471-1479.
- 32) Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg.* 1984, 6: 938-947.

別刷請求先:

(〒 060-8543) 札幌市中央区南 1 条西 16 丁目

札幌医科大学医学部口腔外科学講座 金城尚典