

## 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 —

仲 盛 健 治 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)

Prognostic Value of Rate of Cells exceeding 4c DNA content in Oral Squamous  
— Cell Carcinoma with Special Reference to Mode of Cancer Invasion —

Kenji NAKAMORI, Makoto NOGUCHI and Gen-iku KOHAMA  
*Department of Oral Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine*  
(Chief : Prof. G. KOHAMA)

**ABSTRACT** This study was performed to elucidate the clinical significance of the nuclear DNA content of cancer cells in each mode of cancer invasion of oral squamous cell carcinoma. Cytophotometric DNA content was analyzed in tissue sections from biopsied specimens of 107 patients with squamous cell carcinoma. Contents of cells from the edge portion were analyzed in terms of rate of occurrence of cells with content exceeding 4c (Exceeding rate of 4c : 4cER). The cells having DNA content exceeding 4c are regarded as polyploid and/or aneuploid cells.

According to our analysis, the relationships of 4cER with clinical findings, histopathological findings, and prognosis were as follows :

1. Clinically advanced cancers, such as T4 and/or stage IV, or cancers with endophytic growth type tend to have high 4cER compared to cancers of small size and early stage ( $p < 0.01$ ).
2. Cancers with histologically high malignancy, such as poorly differentiated, high degree of cellular atypism (C. A. T. III), marked mitosis, and diffuse invasion tend to have high 4cER ( $p < 0.01$ ).
3. 4cER correlated with tumor size based on each mode of cancer invasion, except mode 4C.
4. Patients with 4cER less than 10% had better prognoses than those with over than 10% (92.5% vs. 57.3%,  $p < 0.01$ ).
5. Patients of mode-1, 2, who showed low 4cER and low malignancy, had an excellent 5-year cumulative survival rate (100% in mode-1, 2 respectively). Among patients of mode-3, the 5-year cumulative survival rate of patients with 4cER less than 10% was significantly higher than those with over than 10% (90.0% vs. 51.0%  $p < 0.01$ ). Furthermore, among patients of mode-4C, 4D, there was a trend toward enhanced 5-year cumulative survival rate in patients with 4cER less than 10%.

These results suggest that analysis of nuclear DNA content in combination with the mode of cancer invasion allows a more accurate prediction of prognosis and shows excellent promise for clinical evaluation and management of oral squamous cell carcinoma.

(Received February 14, 1995 and accepted March 20, 1995)

**Key words :** DNA content, Oral squamous cell carcinoma, Prognosis

### 1 緒 言

近年、癌の診断とそれに基づく治療法の選択に際

し、各々の癌の進展度はもとより生物学的特性を考慮することの重要性が指摘されている<sup>1)</sup>。著者らはこれまで、口腔扁平上皮癌の形態学的観察に基づいた一連

の検討を行い、発育先進部における病理組織学的所見が癌の悪性を反映し、なかでも癌浸潤様式は治療効果や頸部リンパ節転移および予後と密接に関連する極めて重要な所見であることを報告してきた<sup>2-12)</sup>。

一方、癌細胞の核 DNA 量は癌の悪性を表し、臨床像や予後と密接に関連することから、各種人癌において広く検討されている<sup>13-23)</sup>。口腔癌においても、核 DNA 量と臨床病態、病理組織学的所見、および予後との関連などについて多くの報告がなされている<sup>6,24-28)</sup>。一般に核 DNA 量の ploidy 解析は、ヒストグラムのパターンから評価されている<sup>13,29,30)</sup>。しかし、Lampe<sup>1)</sup> は、ploidy の判定基準は報告者によって一定ではないため、これを指標として治療法を決定することはできないと指摘している。これに対して、4 倍体超の核 DNA 量をもつ癌細胞の出現率（以下超 4c 率と略す）は、従来の ploidy の判定よりも客観的な悪性の指標となり得ると考えられる。特に、癌の発育先進部における癌浸潤様式別に超 4c 率を算出すれば、より確度の高い悪性を評価し得るものと推測される。しかしこのような観点から口腔癌の核 DNA 量と癌の悪性度および予後との関係を検索して、その臨床的意義を検討した報告はみられない。

本研究では、口腔扁平上皮癌の発育先進部における癌細胞の核 DNA 量を選択的に測定して超 4c 率を算出し、臨床、病理組織学的所見との関連性を検索した。さらに、超 4c 率と癌浸潤様式および治療成績との関連性を解析し、その臨床的意義を検討した。

## 2 対象と方法

### 2.1 対象

対象は 1977 年 4 月から 1994 年 3 月までの 17 年間に札幌医科大学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のうち、治療前の生検組織から癌細胞の核 DNA 量を測定・解析し得た 107 例である。これら対象症例の臨床所見別の内訳を Table 1 に示す。

### 2.2 研究方法

#### 2.2.1 検体採取および染色法

検体採取にあたっては発育先進部における癌の増殖動態の検索ができるように、山本の報告<sup>31)</sup> に準じて生検を行った。生検組織をホルマリン固定・パラフィン包埋した後、厚さ 5 μm の連続切片を作製し通常の Hematoxylin-Eosin (H・E) 染色ならびに岩井の報告<sup>6)</sup> に準じた Feulgen 染色を施した。

#### 2.2.2 癌細胞の核 DNA 量測定および解析方法

はじめに、岩井<sup>6)</sup>、熊谷、岩井<sup>7)</sup> の報告に準じて落射型顕微鏡測光装置 (Nikon P1 system) を用い Feulgen 染色標本の各切片ごとにリンパ球 20 個の蛍光量を測光し、その平均値を理論的 2 倍体値 (2c) とした。リンパ球の測定値の変動係数 (%) <sup>29)</sup> は、最小 9.6%~最大 14.1% にわたり、平均 12.2%、標準偏差は 1.5 であった。正常細胞は細胞周期の過程において 2 倍体 (2c) から 4 倍体 (4c) の核 DNA 量を取り得るが、癌細胞の核 DNA 量はしばしば増加することが知られている<sup>13)</sup>。H・E 染色標本を参考に癌発育先進部における癌細胞を 200 個選択的に測光し、各々の核 DNA 量の相対値を求め、パーソナルコンピューター (NEC PC-9801 RX) を用いて相対値の算出、統計処理および DNA ヒストグラムの作製を行った。また、癌細胞の核 DNA 量の異常増加のパラメータとしての超 4c 率は次式によって算出した。

$$\text{超 4c 率 (\%)} = \frac{\text{超 4c 細胞数}}{\text{全測定細胞数}} \times 100$$

実際の測定例を Fig. 1 に示す。

Table 1 Clinical features of 107 patients with oral squamous cell carcinoma.

	Clinical findings	No. of patients
Sex	Male	79
	Female	28
Age	-29	3
	30-39	8
	40-49	19
	50-59	28
	60-69	31
	70-79	15
Site	80-	3
	tongue	80
	floor of the mouth	12
	lower gum	7
	buccal mucosa	6
	upper gum	2
T-category	T1	26
	T2	49
	T3	12
	T4	20
Clinical stage	I	25
	II	38
	III	19
	IV	25
Growth pattern	exophytic	44
	endophytic	63

2・2・3 臨床所見の検討事項

UICC (1987) の分類基準による T 分類, Clinical stage の他, 外向発育型 (肉芽型, 乳頭型, 白斑型) と内向発育型 (びらん型, 潰瘍型, 腫溜硬結型) の各臨床所見について超 4c 率との関連性を検討した。

2・2・4 病理組織学的所見の検討事項

病理組織学的所見の検討事項は著者らの一連の研究で用いられた方法に準じ<sup>2-11)</sup>, 癌浸潤様式 (M-1 型; 境界線が明瞭である, M-2 型; 境界線にやや乱れがある, M-3 型; 境界線は不明瞭で大小の腫瘍胞巣が散在, M-4C 型; 境界線は不明瞭で小さな腫瘍胞巣が索状に浸潤, M-4D 型; 境界線は不明瞭で腫瘍は胞巣をつくらずび慢性に浸潤) の他, 分化度 (高, 中, 低), 細胞異型度 (弱, 中, 強), 核分裂像 (癌細胞 1000 個あたりの分裂細胞の割合; Mitotic index, 以下 M. I と略す。少; M. I ≤ 0.7, 中; M. I = 0.71 ~ 1.1, 多; M. I > 1.1) について超 4c 率との関連性を検討した。さらに, 上述の各所見に単核細胞浸潤の程度を加え, これらの病理組織学的各所見に付加した点数の総和である malignancy score<sup>5)</sup> (以下 MS と略す) を求めて悪性度の指標とした。

2・2・5 統計処理

超 4c 率の平均値の差の検定は generalized Wilcoxon test, または Kruskal-Wallis test を用い, 腫瘍長径と超 4c 率との相関関係の検討には Spearman の相関係数を用いた。治療成績の評価は Kaplan-Meier 法により 5 年累積生存率 (以下 5 年生存率と略す) を算出し, 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。

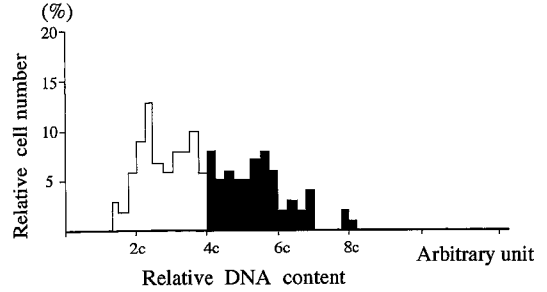


Fig. 1 Histogram of relative DNA content of a case with squamous cell carcinoma of the tongue, Stage I, poorly differentiated type. The rate of cells exceeding 4c DNA content (Exceeding rate of 4c; 4cER) is calculated as follows.

$$4cER(\%) = \frac{\text{Number of cells exceeding 4c DNA content}}{\text{Total number of cells}} \times 100$$

$$= \frac{82}{200} \times 100 = 41.0\%$$

3 結 果

3・1 臨床所見ならびに病理組織学的所見と超 4c 率との関連性

対象 107 症例の超 4c 率は最低 0% ~ 最高 51.0% にわたり, その平均値は 10.5%, 標準偏差は 11.7 であった。また, 臨床所見および病理組織学的所見別に各群における超 4c 率の平均値および標準偏差を算出し, 以下の結果を得た。

臨床所見と超 4c 率との関係をみると, T 分類では T4, Clinical stage では Stage IV, 発育様式では内向発育型の所見を有する癌で, 超 4c 率は高値を示す傾向であった (p < 0.01) (Table 2)。

Table 2 Relationship between clinical findings and rate of cells exceeding 4c DNA content (Exceeding rate of 4c; 4cER).

Clinical findings		No. of patients	4cER (%)	
			mean	Standard deviation (S. D.)
T-category	T1	26	5.9	9.1
	T2	49	13.0	11.8
	T3	12	10.0	7.5
	T4	20	18.9	11.7
Clinical stage	I	25	6.1	9.2
	II	38	12.1	10.0
	III	19	10.8	10.8
	IV	25	18.9	12.9
Growth pattern	exophytic	44	6.7	6.5
	endophytic	63	15.8	12.7

The average of 4cER is closely related to the each clinical finding (\*\*: p < 0.01).

Table 3 Relationship between histopathological findings and 4cER.

Histopathological findings	Total of cases		Stage I, II		Stage III, IV		
	No. of patients	4cER(%)	No. of patients	4cER(%)	No. of patients	4cER(%)	
		mean±S. D.		mean±S. D.		mean±S. D.	
Differentiation	well	41	10.4±10.2	20	7.9±9.6	21	12.8±10.4
	moderately	48	10.6±10.7	32	8.5±8.8	16	14.7±13.3
	poorly	18	19.9±13.4	11	16.7±12.4	7	24.8±14.3
Degree of cellular atypism	I	13	9.1±8.8	9	10.4±9.8	4	6.1±5.9
	II	64	9.8±10.3	37	7.8±9.9	27	12.6±10.3
	III	30	18.1±12.9	17	13.6±10.1	13	24.1±14.1
Mitosis	slight	27	8.3±9.8	18	5.8±8.9	9	13.1±10.1
	moderate	47	9.5±9.5	27	7.6±7.6	20	12.0±11.4
	marked	33	18.9±12.5	18	16.8±11.3	15	21.3±13.8
Mode of cancer invasion	M-1	12	4.8±4.4	11	4.6±4.6	1	6.0
	M-2	24	6.1±5.3	15	5.7±5.8	9	6.7±4.8
	M-3	41	13.7±11.6	22	11.9±11.2	19	15.8±12.0
	M-4C	18	15.3±12.7	7	13.2±16.2	11	16.7±10.5
	M-4D	12	20.8±14.1	8	15.2±7.9	4	32.0±18.2

The average of 4cER is closely related to the each histopathological finding (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ).

病理組織学的所見と超4c率の関係をみると、分化度では低分化の癌、細胞異型度では細胞異型性の強い癌、また核分裂像では核分裂像の多い癌で、超4c率は高値を示す傾向であった ( $p < 0.01$ )。癌浸潤様式別の超4c率をみると、M-1~M-4C、4Dと浸潤が高度になるに従って超4c率は高値を示す傾向であった ( $p < 0.01$ )。また、Stage I, II群ならびに Stage III, IV群に分けて検討した結果も、病理組織学的所見と超4c率との間に同様の関連性を認めた (Table 3)。

これら病理組織学的所見の総合的評価から得られた Malignancy score (MS)<sup>5)</sup> と超4c率との関係を癌浸潤様式別にみると、M-1, 2型ではMS 5~10点、超4c率は0~15.0%であり、M-3型はMS 7~14点、超4c率は1.0~42.0%と広範囲に分布した。M-4C型ではMS 10~15点、超4c率は0~43.0%に、M-4D型ではMS 12~16点、超4c率は1.0~51.0%とM-3型と同様に広範囲に分布していた。すなわちM-1, 2型ではMSは低く、超4c率は低値であったが、M-3, 4C, 4D型と浸潤が高度になるに従ってMSは高く、超4c率も高値を示す症例が多くなり、さらに超4c率の値が広範囲に分散する傾向であった。また、M-4C, 4D型ではMS 11点以上の症例が多く認められた (Fig. 2)。

### 3・2 癌浸潤様式別の腫瘍長径と超4c率の関連性

癌の増大または浸潤が高度になるに従って超4c率が高く、しかも広範囲に分散する傾向が認められた。

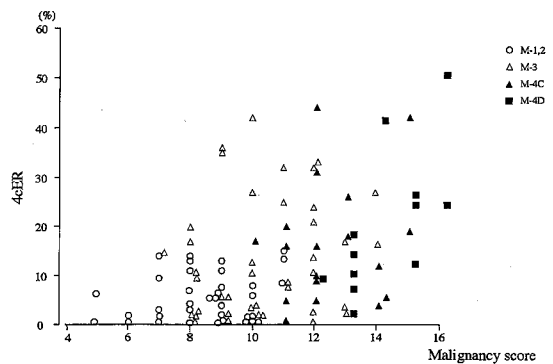


Fig. 2 Relationship between 4cER with malignancy score and mode of cancer invasion.

そこで、癌浸潤様式別に腫瘍長径を横軸、超4c率を縦軸として各症例の測定値をプロットして散布図を作製し、腫瘍長径と超4c率との関連性を検討した。

M-1, 2型症例群：M-1, 2型の超4c率は0~15.0%の範囲に分布した。腫瘍長径と超4c率は相関係数  $r = 0.39$  ( $p = 0.02$ ) と正の相関を示し、回帰式は  $Y = 0.13X + 2.08$  であった (Fig. 3-(A))。

M-3型症例群：腫瘍長径は14 mm~75 mm、超4c率は1.0~42.0%の範囲に分布していた。両者の関係は回帰式  $Y = 0.34X + 1.53$ ,  $r = 0.39$  ( $p = 0.01$ ) で示され、腫瘍長径の増大に伴って超4c率は高値となる傾向であった (Fig. 3-(B))。

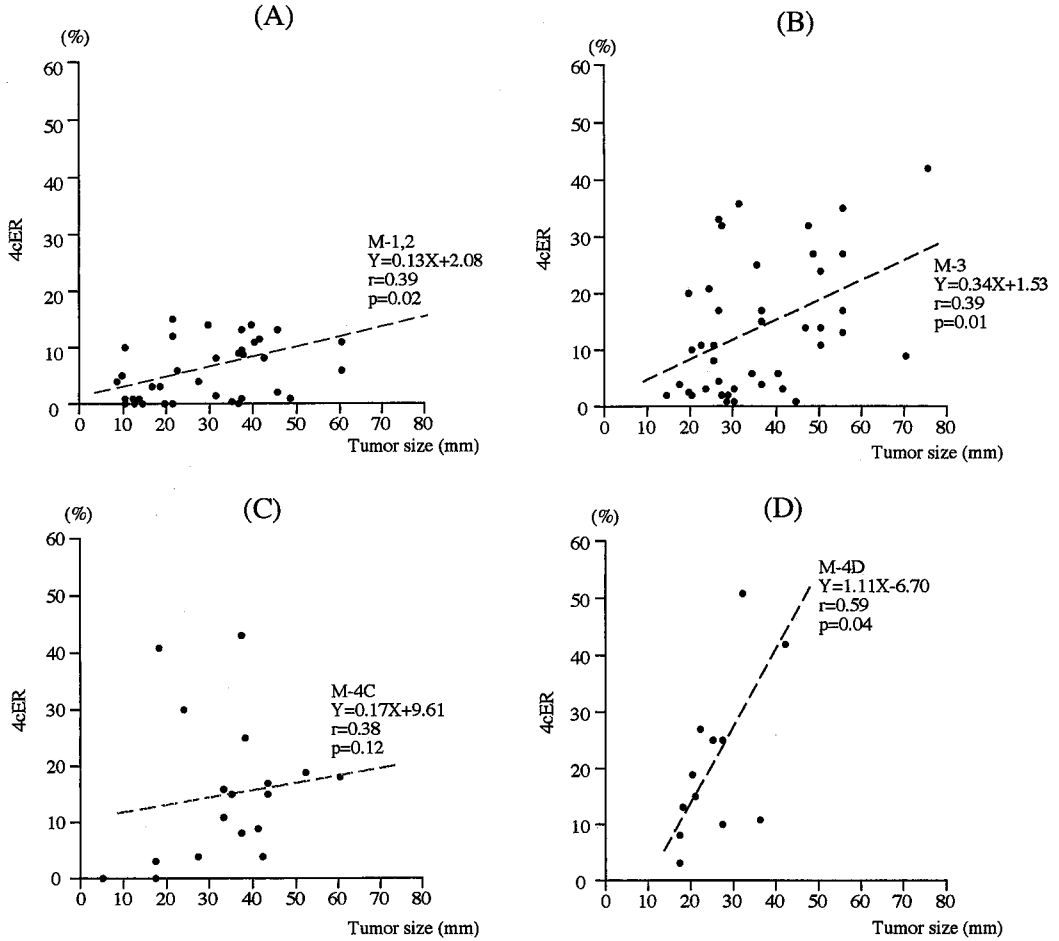


Fig. 3 Relationship between tumor size and 4cER in patients with M-1, 2 (A), M-3 (B), M-4C (C) and M-4D (D)

M-4C型症例群：腫瘍長径5~60mm，超4c率は0~43.0%に分布したが，相関係数 $r=0.38$  ( $p=0.12$ )と両者の間に相関関係は認められなかった (Fig. 3-(C))。

M-4D型症例群：腫瘍長径17~42mm，超4c率は3.0~51.0%に分布した。腫瘍長径と超4c率は相関関係 $r=0.59$  ( $p=0.04$ )と正の相関を示し，回帰式は $Y=1.11X-6.70$ であった (Fig. 3(D))。

3・3 超4c率と治療成績

対象症例のうち，外科療法を主体に加療した症例は104例であった。全対象症例における超4c率の平均値を参考にしてこれら104例を超4c率10%未満群と10%以上群に大別し，5年生存率を算出した結果をFig. 4-(A)に示した。超4c率10%未満群の5年生存率は92.5%であるのに対し，10%以上群では

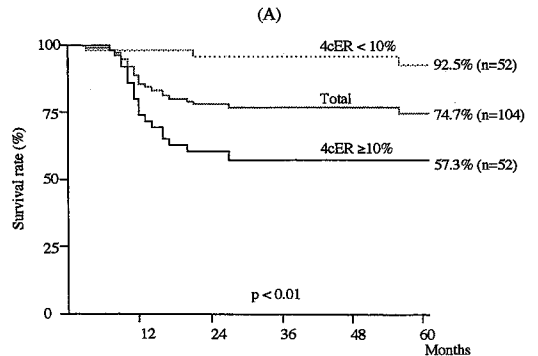


Fig. 4-(A) Relation of survival rates to 4cER in 104 patients. The survival rate of patients with 4cER < 10% was significantly better than those with 4cER ≥ 10% ( $p < 0.01$ , Longrank Test).

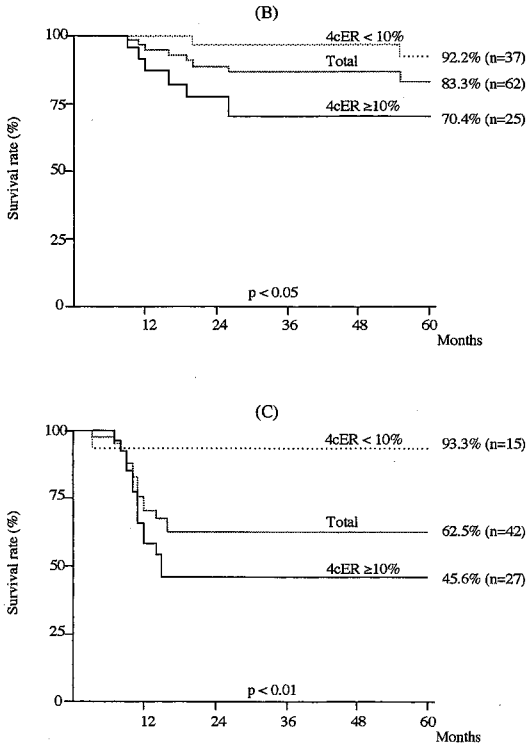


Fig. 4- (B), (C) Relation of survival rates to 4cER in patients with stage I, II (B) and stage III, IV (C).

The survival rate of patients with 4cER < 10% was significantly better than those with 4cER ≥ 10% in stage I, II (B) ( $p < 0.05$ ), and in stage III, IV (C) ( $p < 0.01$ , Logrank Test).

57.3%であり、両群間の5年生存率に有意差を認めた。これら104例をStage I, IIならびにStage III, IVに分けて超4c率と治療成績との関係を検討した結果、いずれにおいても超4c率10%未満群の5年生存率は10%以上群に対して有意に高値を示した (Fig. 4-(B, C))。

### 3.4 癌浸潤様式別の超4c率と治療成績

癌浸潤様式別の5年生存率はFig. 5に示す如くM-1, 2型症例群; 100.0%, M-3型症例群; 68.1%, M-4C型症例群; 50.6%, M-4D型症例群; 50.9%であった。各浸潤様式別の超4c率と治療成績について検討すると、M-1型症例群の超4c率は平均4.8%またM-2型症例群の超4c率は平均6.1%であり5年生存率は両群ともに100%と良好であった。また、M-3型、M-4C型、M-4D型症例群の超4c率と治療成績との関連性をFig. 6-(A, B)に示した。M-3型症例群において超4c率10%未満群の5年生存率は90.0%で

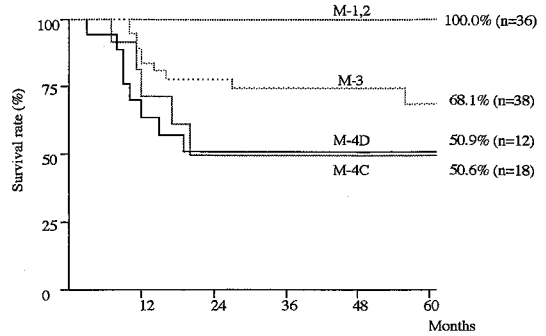


Fig. 5 Relation of survival rates to mode of cancer invasion.

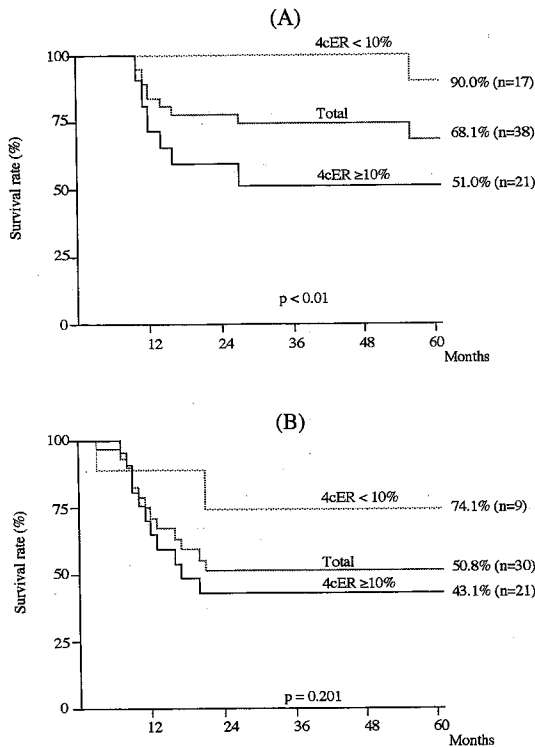
The patients with M-1, 2 had good prognoses, but those with M-4C and 4D had poor prognoses. Patients with M-4C and M-4D are similar survival curves.

あるのに対し、10%以上群では51.0%であり両群間の5年生存率に有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。M-4C型症例群とM-4D型症例群の生存曲線はほぼ同様の推移を示したため、M-4C型およびM-4D型の両群を併せて超4c率と治療成績との関連性を検討した。M-4C, 4D型症例群における超4c率が10%未満群の5年生存率は74.1%であるのに対し、10%以上群では43.1%であり、有意差は認められないものの、10%未満群の5年生存率が高い結果が得られた ( $p = 0.201$ )。

## 4 考 察

核DNA量の測定には顕微蛍光測光装置 (Cytophotometry; 以下CPMと略す) やフローサイトメトリー (Flow cytometry; 以下FCMと略す)、イメージサイトメトリー (Image cytometry; 以下ICMと略す) などが用いられている。FCMは500~5000個/秒の高速で個々の細胞を測定できる長所があるが、測定細胞の選択や形態観察は困難である<sup>14)</sup>。これに対して、CPMやICMはスライドガラス上の細胞の核DNA量を蛍光光度 (CPM) や濃淡画像データ (ICM) として測定する方法で、FCMに比べて測定細胞数は少ないものの、測定細胞の選択や形態観察が可能である<sup>14)</sup>。本研究では発育先進部の癌細胞を選択的に測定・解析することを目的としたため、組織切片上の癌細胞の核DNA量をCPMにより測定した。

核DNA量の異常をきたした細胞、すなわち多倍体細胞 (polyploid cell) や異数倍体細胞 (aneuploid cell) は、DNAヒストグラム上で2倍体細胞とは異なる位



**Fig. 6-** (A), (B) Relation of survival rates to 4cER in patients with M-3 (A) and M-4C, 4D (B). The survival rate of patients with 4cER < 10% was better than those with 4cER ≥ 10% in M-3(A). While there were no statistical differences between survival rates, survival rate of patients with 4cER < 10% was better than those with 4cER ≥ 10% in M-4C, 4D (B) (Logrank test).

置に G0/G1 ピークを形成する<sup>15)</sup>。癌細胞の核 DNA 量の解析は、これら異常ピークの出現の有無から倍数性 (ploidy) を評価することが一般的である<sup>13,29,30)</sup>。しかしヒストグラムの形状に基づく ploidy の評価は報告者によりその基準が一定ではないため、核 DNA 量の偏差や、多倍体細胞の出現頻度などのパラメータを用いて核 DNA 量の異常を数量化した解析が試みられている<sup>16,17)</sup>。

本研究で着目した超 4c の細胞集団は、1) G0/G1 期において核 DNA 量が 4 倍体を超えるもの (polyploid cell または aneuploid cell)、2) G0/G1 期において高 2 倍体～低 4 倍体の間の核 DNA 量をもち (aneuploid cell)、S～G2/M 期に超 4c となったものから構成されると考えられる。また、超 4c 率は DNA ヒストグラム上では 4c より右側の領域での細胞の出現頻度を表すことから、モードが右方に位置し

たり、広域に分散するといったヒストグラムの形状とも密接に関連すると思われる。以下に、超 4c 率と臨床所見、病理組織学的所見および治療成績との関連性について考察した。

#### 4・1 臨床所見ならびに病理組織学的所見と超 4c 率との関連性

口腔扁平上皮癌の原発巣進展度 (T 分類) や進行度 (Clinical stage) と核 DNA 量との関連性については、原発巣の増大や病期の進行に伴う、広域に分散する DNA ヒストグラムの出現<sup>6,24)</sup> やモードの右方への偏位<sup>25)</sup>、高倍体細胞の出現頻度の増加<sup>26)</sup> などが報告されている。本研究でも、T4 や Stage IV などの進行癌で超 4c 率は高値となる結果であった。これらのことより、癌の増殖・進展に伴い、polyploid cell や aneuploid cell が出現して DNA ヒストグラムの形状に変化をもたらすものと考えられた。口腔扁平上皮癌の発育様式は原発巣進展度とともに悪性度と関連し、内向性発育を示す癌は一般に高悪性と報告されている<sup>2,4)</sup>。本研究において、内向性発育を示す癌の超 4c 率は高値となる傾向を示し、両者の関連性が示唆された。

口腔扁平上皮癌における核 DNA 量と分化度との関連性について、一致した見解は得られていない<sup>6,24,26-28)</sup>。本研究では、超 4c 率と分化度との間に関連性を認め、低分化型の超 4c 率は高・中分化型に比べて有意に高い結果を示した。岩井<sup>6)</sup>、木下ら<sup>24)</sup> は、核 DNA 量および DNA ヒストグラムは核の大小不同性と関連性が強く、細胞異型度を客観的に表すとの考えを述べている。本研究においても超 4c 率と細胞異型度との間に関連性を認め、従来の報告と同様の結果であった。癌細胞の増殖能の推定には、核分裂像の多寡を指標とする他に、放射性同位元素を使用した DNA 合成期の細胞の標識<sup>7)</sup>、特異抗体による増殖細胞の標識<sup>1,32)</sup> などに基づく報告がみられる。熊谷、岩井<sup>7)</sup> は、<sup>3</sup>H-thymidine を用いて解析した結果、モードの位置と分散幅に基づいたヒストグラムパターン分類は細胞異型度にくわえて増殖動態をも反映することを報告した。本研究結果に基づいて考えると、発育先進部における癌細胞集団の超 4c 率は、polyploid cell とともに増殖期の aneuploid cell の多寡を表し、さらに増殖能を反映している可能性が示唆された。

#### 4・2 癌浸潤様式別の超 4c 率

口腔扁平上皮癌における癌浸潤様式は分化度、細胞異型度、核分裂像といった所見に比べて、より強く頸部リンパ節転移<sup>10)</sup> や予後<sup>33)</sup> と関連することから、極

めて重要な所見と考えられている。しかし癌浸潤様式と癌細胞の核 DNA 量との関連性について詳細な検討は行われておらず、び慢性浸潤を示す症例の DNA ヒストグラムが広域に分散する傾向が示されているにすぎない<sup>6,26)</sup>。本研究結果では、M-4C, 4D 型のようにび慢性浸潤を示す癌においても超 4c 率が低値を示す症例が認められたり、M-3 型でも高い超 4c 率を示す症例が認められた。このことより、同様の癌浸潤様式を示す場合でも、核 DNA 量の異常は症例によって一様ではないものと考えられた。そこで、癌浸潤様式別に腫瘍長径を横軸に、超 4c 率を縦軸にとって各症例の測定値をプロットし、両者の関連性を検討した。その結果、M-4C 型を除くそれぞれの癌浸潤様式で、腫瘍長径と超 4c 率には正の相関関係が認められた。すなわち M-1, 2 型の症例群では腫瘍長径の増大に伴い超 4c 率が高くなる傾向にあったが、超 4c 率の増加は軽度であり、最高値でも 15% を超える症例は認められず、長径の大きな癌であっても核 DNA 量の異常をもつ細胞の増加は軽度であるものと考えられた。このような癌の病理組織学的所見の特徴として、ほとんどが高～中分化癌であり、細胞異型性は弱く、核分裂像の少ない MS 10 点以下の低悪性の所見を有するものであった。M-3 型の症例群では、腫瘍長径と超 4c 率との間に正の相関関係を認めたが、腫瘍長径が 25 mm 以上の症例では、症例間の超 4c 率が分散する傾向を示した。M-4C 型の症例群では、症例間における超 4c 率の分散が著しく、腫瘍長径と超 4c 率との間に関連性は認められなかった。M-3 型、M-4C 型症例群は病理組織学的にも、細胞異型性は弱い～中等度、核分裂像は中等度～多い、MS 10～12 点の中～高悪性度癌が多く、超 4c 率は広範囲に分散することから、これらの癌の多様性がうかがわれた。近年、癌細胞の遺伝的不安定性に p 53 遺伝子の変異が関連している可能性が示されており<sup>24)</sup>、核 DNA 量の異常のみならず、このような遺伝子レベルでの検索をも併せて検討することが必要と思われた。M-4D 型症例群では、腫瘍長径と超 4c 率とは M-1～3 型に比較してより強い相関性を示し ( $r=0.59$ )、さらに回帰式の一次係数が M-1～3 型に比べて大きい値となった。この中には、細胞異型性の強い、核分裂像は中等度～多い、中～低分化癌で、MS 13～16 点の高悪性度癌が多く見られた。これらの結果から、癌の増殖・進展に伴う超 4c 率の増加は癌浸潤様式によって異なっている可能性が考えられた。

核 DNA 量の異常から癌の成長過程を解析する試み

が胃癌において報告されており、蒲地ら<sup>18)</sup>は壁深達度を成長の指標とした検討で、成長に伴い遺伝子構造の異常が進行し DNA パターンが不規則となり多倍体化が進行すると推論している。Sugihara *et al.*<sup>19)</sup>は、aneuploid cell が主体の癌では腫瘍長径の小さいうちから深部浸潤をきたすが、腫瘍長径が増大しても diploid cell が主体の癌では限局性であることから、深部浸潤には aneuploid cell が重要な役割をはたしているとし、さらに、aneuploid 化や polyploid 化といった核 DNA 量の異常は時間的な要因(腫瘍の大きさ)よりむしろ、遺伝的な不安定性に依存すると推論している。これらの諸説と本研究結果を勘案すると、超 4c 率を指標とした癌細胞の核 DNA 量の異常と浸潤様式との関連性について Fig. 7 に示す仮説が考えられた。すなわち成長にかかわらず M-1, 2 型の癌浸潤様式を示す癌は、核 DNA 量の異常が少ない細胞集団で構成され悪性度も低いものと考えられた。一方、核 DNA 量の不安定な細胞集団で構成される癌は、M-4D 型のようにび慢性浸潤を示し、成長に伴い核 DNA 量の異常をもつ細胞の増加が急速に進むものと考えられた。また、M-3 型の浸潤様式を示す癌は、これらの中間の性質をもつ細胞集団で構成されるものと考えられた。なお、M-4C 型症例群の腫瘍長径と核 DNA 量の異常について本研究結果から明らかな関連性は認められず、さらなる検討が必要と思われた。

#### 4.3 超 4c 率と治療成績

超 4c 率をはじめとする高倍体細胞の出現率と生存

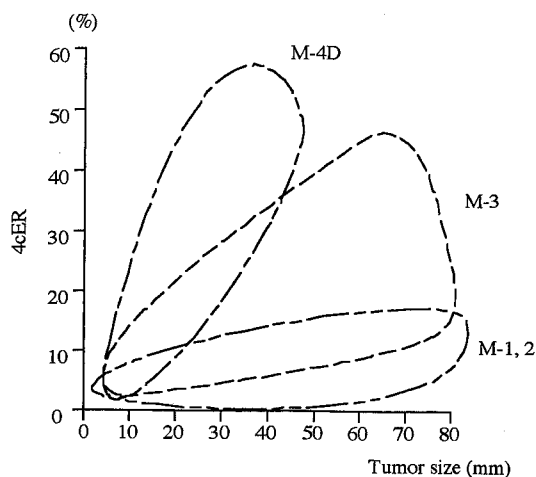


Fig. 7 Hypothetical relationship between tumor size and 4cER in patients with each mode of cancer invasion.



率との関連性については、膀胱癌<sup>20)</sup>、乳癌<sup>21,22)</sup>、卵巣癌<sup>23)</sup>などで検討されており、いずれも高倍体細胞の出現率が高い症例群の生存率が低い傾向である。本研究においても、超 4c 率が 10%以上群の 5 年生存率は、10%未満群に比べて有意に低い結果であった。口腔扁平上皮癌において進展癌や高悪性度の癌は化学療法剤に抵抗性であり<sup>2,4,7,8)</sup>、高頻度に頸部リンパ節転移をきたし<sup>9,10)</sup>、治療成績は不良である<sup>2,4,6,8,33,35)</sup>ことが報告されている。超 4c 率が高値を示すような症例では、aneuploid cell や polyploid cell の占める割合が高く、その中には転移能の高い細胞集団や化学療法剤に感受性の低い細胞集団などが混在し、治療成績に影響を与えた可能性が考えられた。

#### 4.4 癌浸潤様式別の超 4c 率と治療成績

癌浸潤様式は、口腔扁平上皮癌の治療法の選定や予後の推測にあたって重要な悪性度の指標と考えられている<sup>33,35)</sup>。著者らは、癌の進行度のみならず癌浸潤様式を主体とした病理組織学的悪性度を参考として手術法の選択あるいは切除範囲の設定を行い、良好な成績を得てきている<sup>5)</sup>。しかし、本研究結果に示されるように、M-1, 2 型などの低悪性度症例に比べて、M-3, 4C, 4D 型症例の治療成績は必ずしも満足のいくものではない。また、同様の癌浸潤様式を示す場合でも、良好な経過をとる症例や、癌の制御に失敗する症例がみられることから、より詳細な検討が必要と考えられる。そこで、癌浸潤様式に超 4c 率を併せて検索することの臨床的意義を明らかにするために、癌浸潤様式別の超 4c 率と治療成績との関連性を検討した。

M-1, 2 型症例群には腫瘍死症例は認められず、その治療成績は極めて良好であった。これらの症例は腫瘍長径の増大によっても核 DNA 量の異常をもつ細胞の増加が軽度で悪性度が低く、高い生存率が得られたものと考えられた。一方、M-3 型症例群の 5 年生存率は 68.1%とおおむね良好であった。これら M-3 型症例群について、超 4c 率を併せて 5 年生存率を検討したところ、超 4c 率 10%未満群では 90.0%であるのに対し、10%以上群では 51.0%と明らかに異なる結果であった。そこで、腫瘍長径と超 4c 率との関連性から考察すると、M-3 型の症例では癌の進展に伴い核 DNA 量の異常をもつ細胞が増加し、組織学的にも悪性度が高まることで治療成績が不良となるものと考えられた。

山本ら<sup>12)</sup>は、M-4C, 4D 型症例は M-1~3 型症例に比べて局所再発を起こしやすいことを報告した。また、宮川ら<sup>9)</sup>は、潜在性頸部リンパ節転移に関連する

臨床的、病理組織学的所見について検討し、多変量解析の結果、転移の有無に最も影響を与えるアイテムは癌浸潤様式であり、そのなかで M-4C, 4D 型は極めて大きい転移関連因子であることを明らかにした。このように M-4C, 4D 型症例は局所再発や頸部リンパ節転移をきたしやすく、治療成績は極めて不良であるとされている<sup>35)</sup>。しかし M-4C, 4D 型症例群のなかでも超 4c 率が 10%未満と低値を示す症例群では、74.1%とほぼ良好な 5 年生存率を示した。このことは、M-4C, 4D 型でも早期癌であって、低い超 4c 率を示すような多様性が乏しく増殖能が低いと考えられる場合には、腫瘍を制御し得る可能性が高いことを意味していると思われた。

以上のことから、口腔扁平上皮癌の発育先進部における癌浸潤様式別に検索した超 4c 率は、癌の悪性度および治療成績をよく反映した。従ってこれらの癌浸潤様式別に検索した超 4c 率は、治療法の選定や予後を推定する際に重要な情報を提供し、臨床的意義が極めて大きいことが示唆された。

## 5 まとめ

口腔扁平上皮癌 107 例の細胞核 DNA 量を測定し、4 倍体超の核 DNA 量をもつ細胞の出現率 (超 4c 率) と臨床所見、病理組織学的所見および治療成績との関連性を検索し、さらに癌浸潤様式別にみた超 4c 率の臨床的意義について検討し、以下の結果を得た。

### 1) 臨床所見ならびに病理組織学的所見と超 4c 率との関連性

T 分類, Clinical stage, 発育様式と超 4c 率との間には関連性があり、病理組織学的所見では、分化度, 細胞異型度, 核分裂像, 癌浸潤様式と超 4c 率との間にも関連性が認められた ( $p < 0.01$ )。

### 2) 癌浸潤様式別の超 4c 率の特徴

M-1, 2 型では超 4c 率は 0~15%に分布し、M-3 型では腫瘍長径の増大に伴い超 4c 率は高値を示し、長径 25 mm 以上では分散する傾向であった。M-4C, 4D 型では、症例間の超 4c 率の分散が著明であった。M-4C 型を除く癌浸潤様式 M-1 型~M-4D 型では、腫瘍長径と超 4c 率との間に正の相関関係を認め、浸潤傾向が強くなるに従い、回帰式の一次係数は高値となった。

### 3) 超 4c 率と治療成績との関連性

外科療法を主体に加療した 104 例の超 4c 率別の 5 年生存率は、超 4c 率 10%未満群 92.5%, 10%以上群 57.3%であり、両群間には有意差が認められた ( $p <$

0.01). さらに, Stage 別に検討した結果もほぼ同様であった。

#### 4) 癌浸潤様式別の超 4c 率と治療成績

M-1, 2 型症例群では, 超 4c 率が低値で低悪性度の症例が多く 100.0% と極めて良好な 5 年生存率であった。M-3 型症例群では, 超 4c 率 10% 未満群の 5 年生存率は 90.0%, 10% 以上群の 5 年生存率は 51.0% であり, 両群間の 5 年生存率には有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。M-4C, 4D 型症例群においても, 超 4c 率 10% 未満群の 5 年生存率は 74.1%, 10% 以上群の 5 年生存率は 43.1% であり, 有意差は認められないものの超 4c 率 10% 未満群は 10% 以上群に比べて高い 5 年生存率を示した ( $p = 0.201$ )。

以上, 口腔扁平上皮癌の発育先進部における癌細胞の核 DNA 量を測定し, 癌浸潤様式別に検索した超 4c 率は, 癌の悪性度および治療成績を反映することが明らかとなった。従って癌浸潤様式別に超 4c 率を検索することは, 治療法の選定や予後を推定する際に重要な情報を提供し, 臨床的意義が極めて大きいことが示唆された。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御校閲をいただきました本学病理学第一講座菊地浩吉教授に深甚なる感謝の意を表します。また, 本研究に際して種々御協力いただきました教員各位に深謝いたします。

本論文の要旨は, 第 18 回日本頭頸部腫瘍学会総会 (1994 年 6 月, 札幌), 第 39 回日本口腔外科学会総会 (1994 年 11 月, 名古屋) において発表した。

#### 文 献

- Lampe HB. DNA analysis of head and neck squamous cell carcinoma by flow cytometry. *Laryngoscope* 1993, 103: 637-644.
- 小浜源郁. 口腔癌の化学療法効果に関する臨床, 病理, 細胞性免疫学的研究—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—. *日口腔科会誌* 1984, 33: 672-698.
- 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.
- 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.
- 小浜源郁. 舌癌—診断と外科療法. *日口腔外会誌* 1989, 35: 1710-1714.
- 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.
- 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  $^3\text{H}$ -thymidine オートラジオグラフィーの併用による解析—. *札幌医誌* 1985, 54: 517-530.
- 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—特に腫瘍縮小効果と組織学的効果との関連性について—. *札幌医誌* 1989, 58: 317-329.
- 宮川 明, 平塚博義, 小浜源郁. 口腔癌の潜在性頸部リンパ節転移に関する臨床的, 病理組織学的研究. *札幌医誌* 1993, 62: 43-53.
- 宮川明, 小浜源郁, 山本悦秀, 砂川 元, 安達弘高, 平塚博義. 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—. *日口腔外会誌* 1983, 29: 1555-1561.
- 山本悦秀, 砂川 元, 小浜源郁. びまん性浸潤型口腔扁平上皮癌に関する研究. *日口腔外会誌* 1982, 28: 1471-1479.
- Noguchi M, Kohama G, Hiratsuka H, Sekiguchi T. Clinical significance of laminin deposition and T-cell infiltration in oral cancer. *Head Neck* 1993, 15: 125-132.
- 安田範夫, 大槻晃直, 後藤達也, 久 育男, 村上泰. 喉頭上皮および癌の核 DNA 定量—臨床応用への基礎的検討—. *日耳鼻会報* 1989, 92: 1876-1883.
- 西谷 巖, 井筒俊彦. 子宮頸癌細胞診—Flow および Image cytometry の応用—. *臨病理* 1993, 特 94: 51-65.
- 高本 滋, 太田和雄. Flow cytometry による腫瘍マーカーとしての異数倍数体の検索. *最新医* 1985, 40: 104-109.
- Böcking A, Adler CP, Common HH, Hilgarth M, Granzen B, Auffermann W. Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Anal Quant Cytol Histol* 1984, 6: 1-8.
- 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.
- 蒲地正浩, 諸富直文, 橋本敏和, 藤本高久, 藤山桂秀, 香川恵造, 出口武司, 島田信男, 小玉正智, 芦原司. 深達度よりみた胃癌の DNA-RNA 顕微蛍光測光法による解析. *癌と化療* 1984, 11: 2342-2347.
- Sugihara H, Hattori T, Fukuda M, Katsura K, Fujita S. Progression of signet ring cell car-

- cinomas in the human stomach. *Cancer* 1993, 71: 1938-1947.
20. Tachibana M, Deguchi N, Baba S, Jitsukawa S, Hata M, Tazaki H. Multivariate analysis of flow cytometric deoxyribonucleic acid parameters and histological features for prognosis of bladder cancer patients. *J Urol* 1991, 146: 1530-1534.
  21. Siitonen SM, Kallioniemi OP, Helin HJ, Isola JJ. Prognostic value of cells with more than 5c DNA content in node-negative breast cancer as determined by image cytometry from tissue sections. *Hum Pathol* 1993, 24: 1348-1353.
  22. Ravdin PM, Clark GM, Hough JJ, Owens MA, McGuire WL. Neural network analysis of DNA flow cytometry histograms. *Cytometry* 1993, 14: 74-80.
  23. Wagner TMU, Adler A, Sevelde P, Assmann I, Knepfle CF, Czerwenka K, Heinzl H, Ploem-Zaaijer JJ. Prognostic significance of cell DNA content in early-stage ovarian cancer (FIGO stages I and II/A) by means of automatic image cytometry. *Int J Cancer* 1994, 56: 167-172.
  24. 木下鞆彦, 志村介三, 藤原由直, 本間義郎, 井上聡, 下里 誠, 桐ヶ久保光弘, 浅野信雄, 水谷成孝, 佐藤倫一, 高柳 茂. 口腔病変の臨床的悪性度の指標について 第1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. *日口腔外会誌* 1984, 30: 240-256.
  25. Tylor M, Franzen G, Olofsson J. DNA pattern in oral cavity carcinomas in relation to clinical stage and histological grading. *Pathol Res Pract* 1987, 182: 202-206.
  26. 今井 裕, 鈴木克昌, 佐々木忠昭, 永島知明, 岡部清幸, 篠原 真, 似内一郎, 藤田高志, 細谷玲子, 横倉幸弘, 坂元晴彦, 朝倉昭人, 安田真一. 口腔扁平上皮癌における核 DNA ploidy pattern の検討. *日口腔科会誌* 1992, 41: 30-36.
  27. 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. *日口腔外会誌* 1980, 26: 583-600.
  28. 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—. *日口腔外会誌* 1980, 26: 279-294.
  29. 鈴木宏志, 木村 修, 西平哲郎, 藤田哲也, 芦原司, 福田 優, 貝原信明, 進藤勝久, 田口忠宏, 是永大輔, 松本好市, 浜田新七, 浦田洋二, 実方一典, 岡島邦雄. 癌 DNA 研究会用語検討委員会報告. 癌の臨 1991, 37: 1-3.
  30. Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M, Barlogie B, Herman CJ, Leif RC, Mayall BH, Murphy RF, Sandberg AA. Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 1984, 5: 445-446.
  31. 山本悦秀. 口腔癌が疑われる病変の生検法. 清水正嗣・小浜源郁編. 口腔癌. 東京, デンタルダイヤモンド社, 1989, 94-96.
  32. 本間義郎, 木下鞆彦, 水谷成孝, 田畑利章, 浅野信雄, 河原健司, 中村昌幸, 志村介三. 核 DNA, RNA 定量と抗 BrdU 抗体を用いた口腔扁平上皮癌の細胞増殖動態解析. *日口腔腫瘍会誌* 1989, 1: 5-10.
  33. 横江義彦, 瀬上夏樹, 村上賢一郎, 西田光男, 兵行忠, 飯塚忠彦. 舌癌の組織学的悪性度と予後との関連について. *日口腔腫瘍会誌* 1990, 2: 164-171.
  34. Lane DP. p 53, guardian of the genom. *Nature* 1992, 358: 15-16.
  35. 山本悦秀, 中川清昌, 藤元栄輔, 室木俊美, 熊谷茂宏, 児島伸也, 高塚茂之. 口腔粘膜癌に対する組織学的悪性度評点法の意義. 癌の臨 1989, 35: 1665-1672.

---

別刷請求先:

(〒060) 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 仲盛健治