

Assesment of prognostic factors of oral squamous cell carcinoma : impact of mode of ivasion and tumor's vascular density on prognosis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30240

口腔扁平上皮癌の予後に関連する因子の検討 —特に癌浸潤様式および脈管密度との関係—

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻細胞浸潤学
(旧講座名：歯科口腔外科学)
(主任：川尻秀一教授)

岡 宗 絢 子

口腔扁平上皮癌症例の治療計画を立案する際、個々の癌の生物学的性格を見極めることは重要である。癌の浸潤様式は臨床的悪性を予測する上で有用であることが報告されている。また腫瘍の脈管密度は癌の脈管新生度を反映しており、予後と関連しうることが指摘されている。そこで本研究は口腔扁平上皮癌の臨床および病理組織学的因子の予後への影響について検討した。研究では、根治を目的に治療を行った口腔扁平上皮癌患者一次症例105人のデータを統計解析した。検討項目として年齢、性別、喫煙歴、飲酒歴、原発部位、原発腫瘍の状態(T因子)、所属リンパ節転移の有無(N因子)、ステージ、細胞分化度、癌浸潤様式、切除断端の状態、血管密度、リンパ管密度を選択した。予後は5年無再発生存率(再発なく術後5年間生存した割合)と5年生存率(術後5年経過した時点で生存した割合)で評価した。単変量解析の結果、切除断端の状態、N因子、癌浸潤様式が5年無再発生存率と関係し、5年生存率には年齢、細胞分化度、N因子、癌浸潤様式が関係した。多変量解析で5年無再発生存率と5年生存率に関係する因子を調査したところ、いずれの指標に対しても癌浸潤様式のみが関係した。なお腫瘍の脈管密度(血管、リンパ管)と予後とは関連しなかった。本研究結果より癌浸潤様式は口腔扁平上皮癌の転帰を予測する上で最も重要であることが明らかになった。

Key words 口腔扁平上皮癌、予後、癌浸潤様式、血管密度、リンパ管密度

口腔に発生する悪性腫瘍の約85%が扁平上皮癌である¹⁾。現在の口腔扁平上皮癌患者の5年生存率は65%前後であるが、悪性は多様であり、良性腫瘍と変わらないようなおとなしい癌もあれば非常に危険な癌もある²⁾。口腔扁平上皮癌の根治的治療は外科切除であり、症例によっては放射線療法や化学療法を組み合わせる。癌を治療するには予後が最も重要な考慮点であるが、口腔は審美的にも機能的にも重要な部分であるため機能保存と根治性の相反するファクターの両立が求められる。したがって、その癌の性格を良く理解した上で治療計画を立てる必要がある。

現在の臨床では国際対癌連合(Unio Internationalis Contra Cancrum, UICC)の定めるTNM分類やステージ(病期)³⁾が治療方針の決定に利用されている。しかし上述したように口腔扁平上皮癌は悪性が様々で、必ずしもステージから予想される転帰にはならない。すなわち早期の癌でも不幸な転帰をとる場合もあれば、進行癌でも完治することも少なくない。

口腔扁平上皮癌の予後を予測する因子として、Yamamotoら⁴⁾の癌浸潤様式分類が注目されている。これは従来からあったJakobssonら⁵⁾の浸潤様式分類をさらに細分化したもので、予後と関連することが報告されている⁶⁾。一方、この癌浸潤様式分類が予後の指標としてどの程度の価値があるのかは十分に解明されていない。

現在の腫瘍学では、癌組織の血管新生は腫瘍の増殖や転移を促進すると考えられている。これに関連して、腫瘍周囲の血管密度が転移や予後と相関することが口腔以外の他臓器の固形癌で報告されている⁷⁾⁻¹⁰⁾。しかし、口腔扁平上皮癌では血管密度が本当に予後と関連するかどうかは研究者間で意見が分かれている¹¹⁾⁻¹⁶⁾。また、口腔扁平上皮癌は血行性転移よりもリンパ行性転移が主体であり、リンパ節転移と予後が密接な関係にあることから、リンパ管新生も浸潤や転移に関与している可能性がある。こうしたことから本研究では、二重染色による同一標本からの癌組織の血管、リンパ管密度を測定し、予後との関係を検討した。

平成23年11月2日受付、平成23年12月7日受理

Abbreviations : UICC, Unio Internationalis Contra Cancrum; TNM, Tumor Node Metastasis; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

癌の予後には多くの因子が関係しているため、個々の因子の関与度や独立した予後因子を特定するには適切な統計学的解析が必要である。しかし、口腔扁平上皮癌に関しては十分な症例数と適切な統計解析で検討された研究は少ない。そこで本研究は、癌浸潤様式および血管密度、リンパ管密度を含めた臨床ならびに病理組織学的因子と予後との関係を詳細に調査し、どの因子が重要であるか検討した。

対象および方法

I. 対象

1995年1月から2006年9月に金沢大学病院歯科口腔外科を受診し根治を目的に手術を受けた157症例のうち、手術後5年間以上の経過観察を行った口腔扁平上皮癌の一次症例を調査対象とした。初診時に既に遠隔転移があり根治が見込めない症例、全身状態が悪いため根治手術を適応しなかった症例、術後の経過観察が出来なかった症例、本疾患以外の疾病で死亡した症例、過去に頭頸部癌あるいは他臓器に扁平上皮癌の既往のある症例、口腔疣贅性癌症例、上皮異形成症例は除外した。

患者の病歴や生活習慣は問診にて調査した。術後の経過観察は1～2か月間隔で口腔内と頸部リンパ節の視診と触診を行うとともに、必要に応じてCT、MRI、陽電子放射断層撮影検査を施行した。

II. 検討した因子

本研究では5年無再発生存率と5年生存率の2つの指標で予後を評価した。5年無再発生存率は最初の手術後5年間に全く再発がなく生存した患者の割合、5年生存率は最初の手術後5年経過した時点で腫瘍の制御状態や再発経験の有無に関わらず生存した患者の割合と定義した。

この2つの指標に対する患者の年齢、性別、喫煙歴、飲酒歴、腫瘍の原発部位、原発巣の状態(T因子)、所属リンパ節への転移状態(N因子)、ステージ、切除断端の状態、細胞分化度、癌浸潤様式、血管密度、リンパ管密度との関連性を統計学的に検討した。なおT因子の評価は2009年にUICCが提唱したTNM分類³⁾に従った。具体的には、T1は最大径が2cm以下、T2は最大径が2cmをこえるが4cm以下、T3は最大径が4cmをこえる、T4は隣接組織に浸潤する、とした。N因子の評価については、手術の際の病理組織検査で所属リンパ節への転移が確認された場合を陽性、確認できなかった場合を陰性とした。ステージの分類は2010年に日本口腔腫瘍学会が発表した口腔癌取り扱い規約¹⁷⁾の基準に従い、次のようにした。ステージIはT1かつN陰性、ステージIIはT2かつN陰性、ステージIIIはT3かつN陰性、もしくはT1～T3で最大径が3cm以下の患側の単発性リンパ節転移あり。ステージIVは、T4、所属リンパ節転移巣の最大径が3cmを超える、対側の所属リンパ節に転移がある、所属リンパ節転移が2個以上、遠隔部位に腫瘍の転移が

ある、以上の項目のどれかが該当した場合とした。

喫煙歴と飲酒歴については初診までに喫煙もしくは飲酒を習慣としていた経験のある症例をそれぞれ「喫煙歴あり」「飲酒歴あり」とした。

III. 病理組織学検査

1. 病理組織学的因子

切除断端の状態と細胞分化度、癌浸潤様式は生検および手術にて採取した切除組織を10%ホルマリン固定し、HE染色したもので評価した。切除断端は切片上で切除断端の3mm以内に癌細胞が存在するものを陽性とした。細胞分化度は2005年の世界保健機関の提唱する細胞分化度分類¹⁸⁾および口腔癌取り扱い規約¹⁷⁾を参考に低分化、中等度分化、高分化の3段階で評価した。

癌浸潤様式はYamamotoら⁴⁾の分類に準じて評価した。すなわち、癌の浸潤先進部の組織像を光顕的に観察し、腫瘍と間質との境界線が明瞭なものを1型、境界線にやや乱れがあるものを2型、境界線が不明瞭で大小の腫瘍胞巣が散在性に認められるものを3型、小さな腫瘍胞巣が索状に浸潤するものを4C型、腫瘍胞巣をつくらずびまん性に浸潤するものを4D型とした(図1)。

2. 血管密度とリンパ管密度

組織切片を免疫組織学検査に利用できた73症例については、腫瘍組織の微小血管密度およびリンパ管密度をそれぞれ抗CD34モノクローナル抗体と抗D2-40モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色した。手技の概略は次のようである。まず4μm厚のパラフィン包埋切片をキシレンおよび100%、80%、50%各エタノールにて脱パラフィンし、過酸化水素水に5分間浸漬し、内因性ペルオキシターゼを不活性化した。その後、200倍希釈の抗CD34抗体(Thermo Fisher Scientific, Waltham, 米国)を滴下し4℃で一晩反応させ、二次抗体ポリマー試薬(ChemMate Dako Envision, Dako, 東京)と30分間室温にて反応させた後に、ニッケル加3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)を用い紺色に発色させた。さらに200倍希釈の抗D2-40抗体(Dako, 東京)を加え4℃で一晩反応させた。洗浄後、ポリマー試薬と30分間室温にて反応させた。発色にはDABを用いた。すなわち、抗CD34抗体で血管を紺色に抗D2-40抗体でリンパ管を茶褐色に二重免疫組織化学染色した。密度の測定はWeidnerら¹⁹⁾の方法を参考にした。弱拡大視野(40倍)にて癌の腫瘍先進部で血管密度が際立って高い部分を3か所選び、強拡大視野(100倍)にて各部の血管数を2回測定した。リンパ管数の測定も同様に行った。100倍視野中の平均血管数、平均リンパ管数をそれぞれ血管密度、リンパ管密度として記録した。

IV. 統計学的解析方法

単変量解析については χ^2 検定を用いた. さらにKaplan-Meier法にて算定した5年累積生存率をLog-rank検定で解析した. 多変量解析はロジスティック重回帰法を用いた. 各統計解析では有意水準を5%未満とした. 統計分析ソフトとしてSPSS1.1版 (SPSS, 東京) とJMP9.0版 (SAS, 東京) を用いた.

成 績

I. 対象症例の内訳

157人の症例から除外症例を除いたところ, 最終的に105人が残った. この105症例を本研究の対象とした(表1). その内訳は男性が58例, 女性が47例であった. 男女比

は1.23 : 1で男性がやや多かった. 患者の年齢では最年少が25歳, 最高齢が91歳, 平均年齢63.9歳であった. 腫瘍の発生部位では舌が最も多く57例, 下顎歯肉が25例, 上顎歯肉が9例, 口腔底が8例, 頬粘膜が6例であった. 喫煙では喫煙歴あり39例, 喫煙歴なし66例であった. 飲酒では飲酒歴あり53例, 飲酒歴なし52例であった. T因子ではT1は30例, T2は54例, T3は8例, T4は13例であった. N因子ではN陰性は80例, N陽性は25例であった. ステージではステージIは30例, ステージIIは41例, ステージIIIは13例, ステージIVは21例であった. 切除断端の状態は切除断端陽性が32例, 切除断端陰性が73例であった. 細胞分化度では高分化型74例, 中等度分化型20例, 低分化型11例であった. 癌

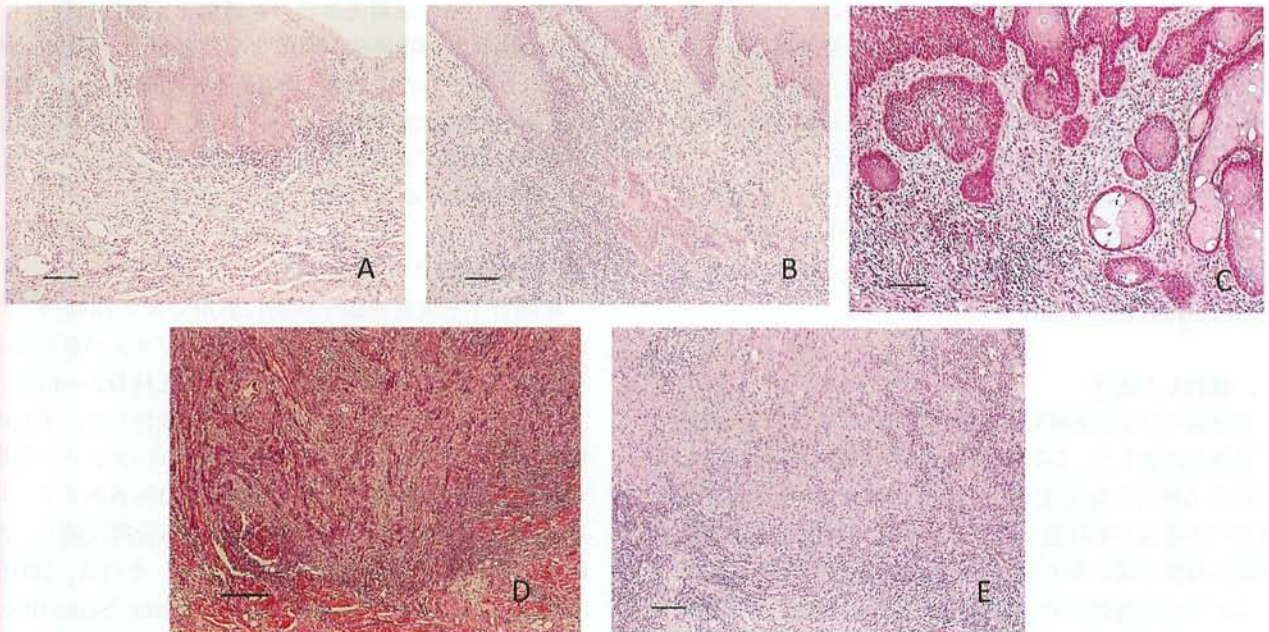


Fig. 1. Classification for mode of invasion. Grade1: A well-defined borderline (A), Grade2: Cords present with a less marked borderline (B), Grade3: Groups of cells with no distinct borderline (C), Grade4C: Diffuse invasion, cord-like type (D), Grade4D: Diffuse invasion, widespread type (E). Scale bar indicates 100 μ m.

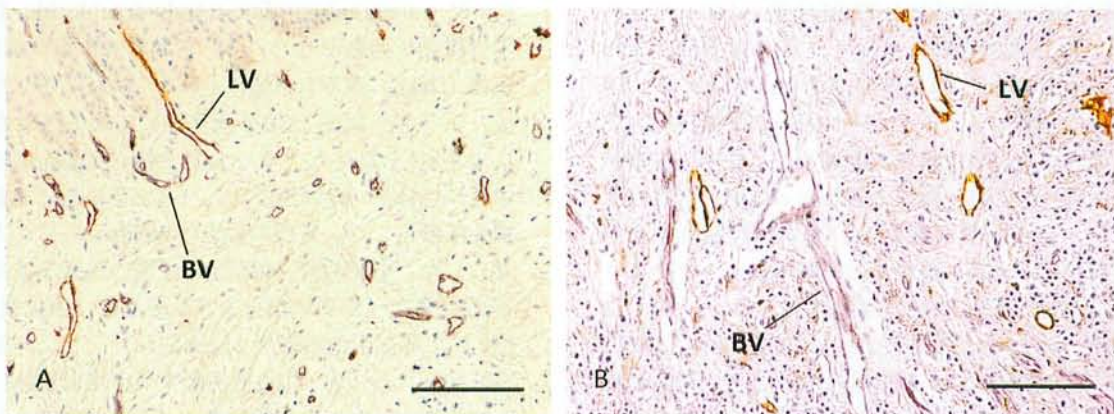


Fig. 2. Double immunostaining with CD34 and D2-40 in a normal tissue of the tongue (A), and a tissue in grade 4C oral squamous cell carcinoma (B). CD34-positive blood vessels (BV) are stained blue, and D2-40-positive lymphatic vessels (LV) are stained brown. Scale bar indicates 500 μ m.

浸潤様式では1型は13例, 2型は19例, 3型は31例, 4C型は38例, 4D型は4例であった。手術については, 原発腫瘍切除のみが64人, 原発腫瘍切除と頸部廓清術を行った症例は41人であった。また術後の補助療法として, 化学療法を52人, 放射線療法を1人, 化学放射線療法を19人に行った。

本研究の対象患者の5年生存率は62% (105人中65人生存) であった。

II. 血管およびリンパ管密度

正常口腔粘膜における血管およびリンパ管は, 粘膜上皮直下の結合織に比較的多く存在した。血管は青く染色

され, 比較的円形を呈するものが多かった。またリンパ管は茶褐色に染色され, 血管と近接した部位に存在し円形を呈するものも認められたが, 扁平なものも多く認められた (図2A)。正常口腔粘膜における血管密度およびリンパ管密度の平均は1視野あたりそれぞれ39.0個と16.4個であった。

一方, 口腔扁平上皮癌の浸潤先進部の血管およびリンパ管は, 腫瘍直下の間質部に散在性に認められた。さらに深部の筋層には既存の血管と思われる大きな血管も観察された。今回の二重染色法では血管とリンパ管が明瞭に染め分けられ, 両者の区別は容易であった (図2B)。算定は血管およびリンパ管新生の旺盛な腫瘍の浸潤先進部を中心に行った。口腔扁平上皮癌における血管密度およびリンパ管密度の平均は1視野あたりそれぞれ32.8個と13.4個であった。

III. 各因子と予後との単変量解析の結果

χ^2 検定の結果, N陽性がN陰性よりも, 切除断端陽性は陰性よりも, 癌浸潤様式4C型もしくは4D型は1~3型よりも有意に5年無再発生存率が低かった (表2)。Log-rank検定においても同様の結果が得られた (図3~6)。5年生存率に関しては年齢が高い方が, 細胞分化度は低い方が, 癌浸潤様式は4C型もしくは4D型である方が有意に低かった。N因子の5年生存率への影響については χ^2 検定ではわずかに有意には達しなかったが強い関連性を認めた ($p = 0.0504$)。Log-rank検定ではN因子は5年生存率と有意に関係した ($p < 0.05$)。脈管密度に関しては, 血管, リンパ管いずれの密度も予後と関係しなかった。本研究では, 血管密度は35個以上と35個未満の症例に, リンパ管密度は10個以上と10個未満の症例に分けて検討を加えてみたが, やはり統計学的な予後との関連性は見いだせなかった (図7, 8)。

Table 1. Characterization of sample (n=105)

Factors	No. of patients	%
Age (y)		
<60	33	31
≥60	72	69
Gender		
Males	58	55
Females	47	45
Smoking		
No	66	62
Yes	39	43
Alcohol		
No	52	40
Yes	53	60
Primary site		
Tongue	57	54
Buccal	6	6
Oral floor	8	7
Gingiva	25	24
Palate	9	9
T		
T1	30	29
T2	54	51
T3	8	8
T4	13	12
N		
Negative	80	76
Positive	25	24
Stage		
Stage 1	30	29
Stage 2	41	39
Stage 3	13	12
Stage 4	21	20
Differentiation		
Well	74	70
Moderate	20	19
Poor	11	11
Mode of invasion		
Grade 1	13	12
Grade 2	19	18
Grade 3	31	30
Grade 4C	38	36
Grade 4D	4	4
Surgical margin		
Negative	73	70
Positive	32	30
Density of blood vessels		
≤35	37	49
>35	36	51
Density of lymphatic vessels		
≤10	33	45
>10	40	55

Table 2. P-values of Chi-square test for association of specific factors with OSCC disease free survival and overall survival

Factors	Disease free 5-year survival	Overall 5-year survival
	Chi-square test	Chi-square test
Age	0.321	0.036
Gender	0.473	0.495
Smoking	0.669	0.702
Alcohol	0.378	0.355
Primary site	0.903	0.429
T	0.128	0.109
N	0.016	0.050
Stage ^{a)}	0.102	0.105
Surgical margin	0.018	0.947
Differentiation	0.610	0.025
Mode of invasion ^{b)}	0.0001	0.002
Density of blood vessels	0.292	0.737
Density of lymphatic vessels	0.451	0.531

^{a)}stage 1-3 vs stage 4.

^{b)}Grade 1-3 vs Grade 4C/4D.

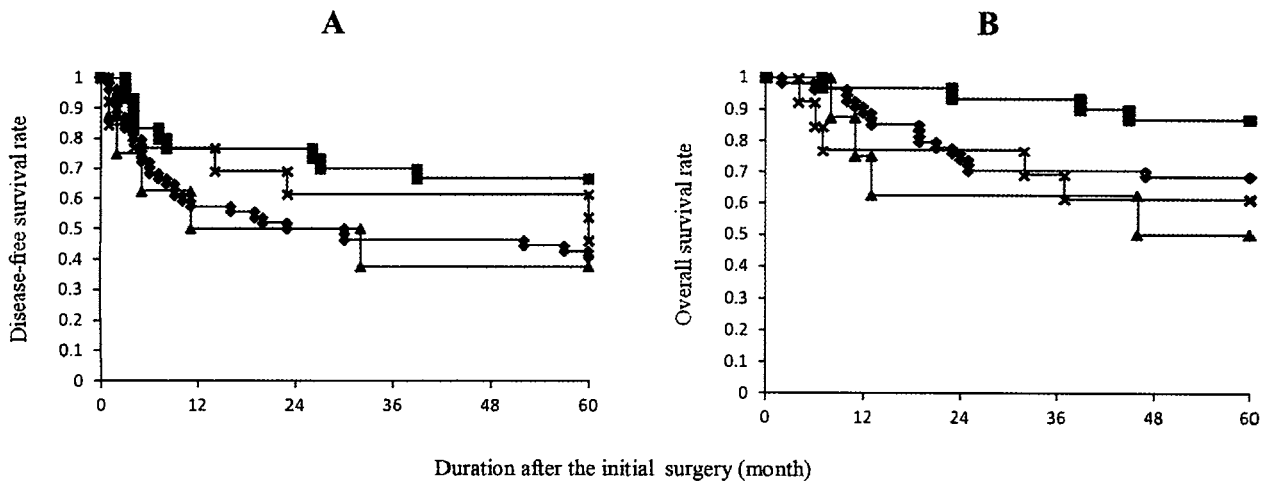


Fig. 3. Survival curves of T factors. Disease-free survival rate (A) and overall survival rate (B). ■T1 ◆T2 ▲T3 ×T4. No statistical significance was found between T factors (Log-rank test).

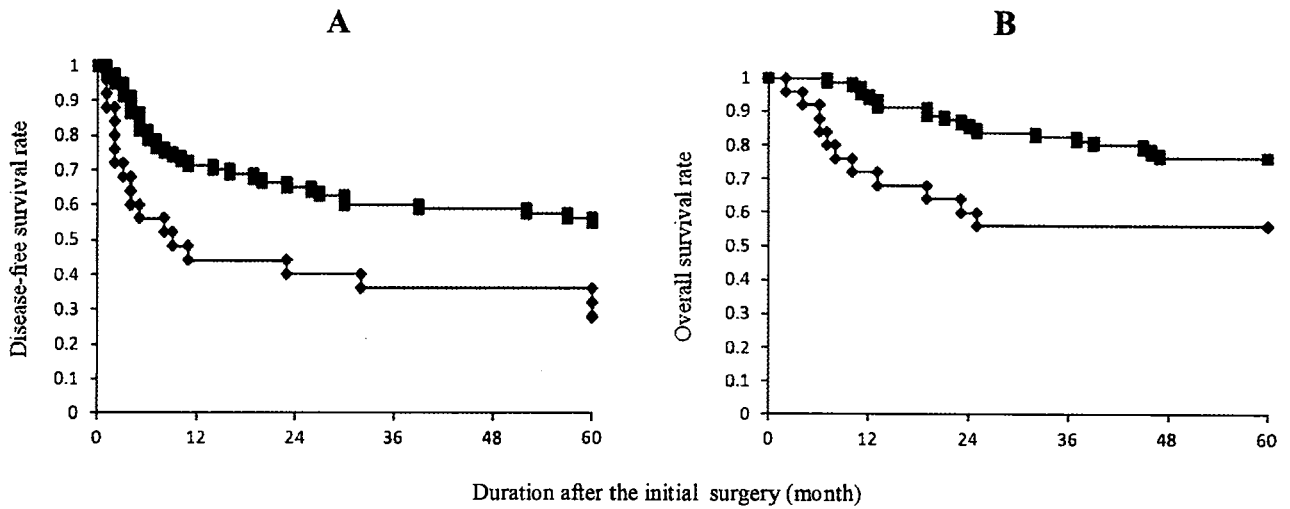


Fig. 4. Survival curves of N factors. Disease-free survival rate (A) and overall survival rate (B). ■N- ◆N+. Disease-free survival rate of N-positive tumors was significantly lower than that of N-negative tumors. With regard to the overall survival rate, there was no significant difference between N-positive and negative tumors (Log-rank test).

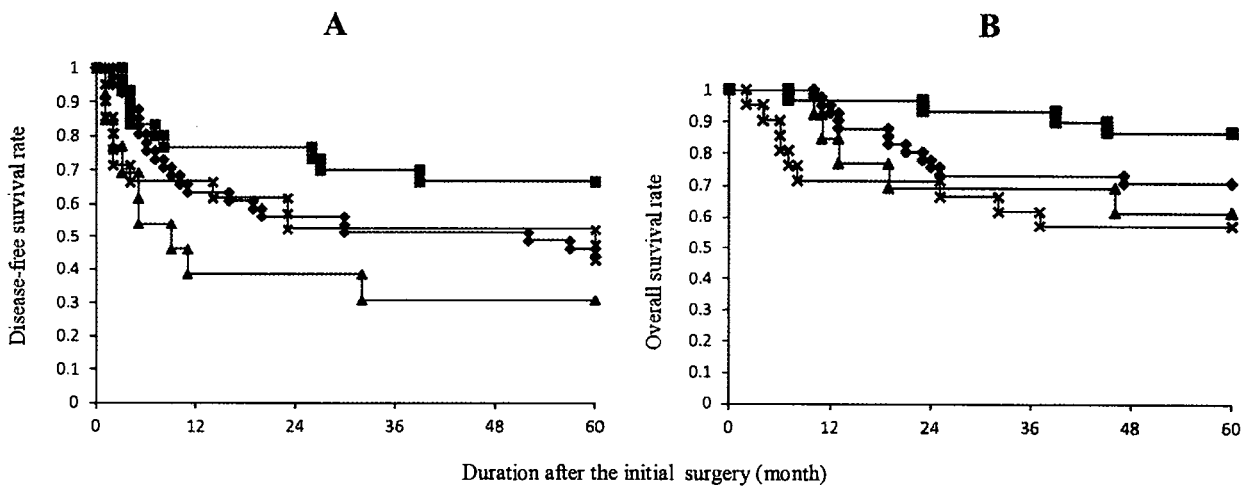


Fig. 5. Survival curves of stage factors. Disease-free survival rate (A) and overall survival rate (B). ■stage1 ◆stage2 ▲stage3 ×stage4. No statistical significance was found between stages (Log-rank test).

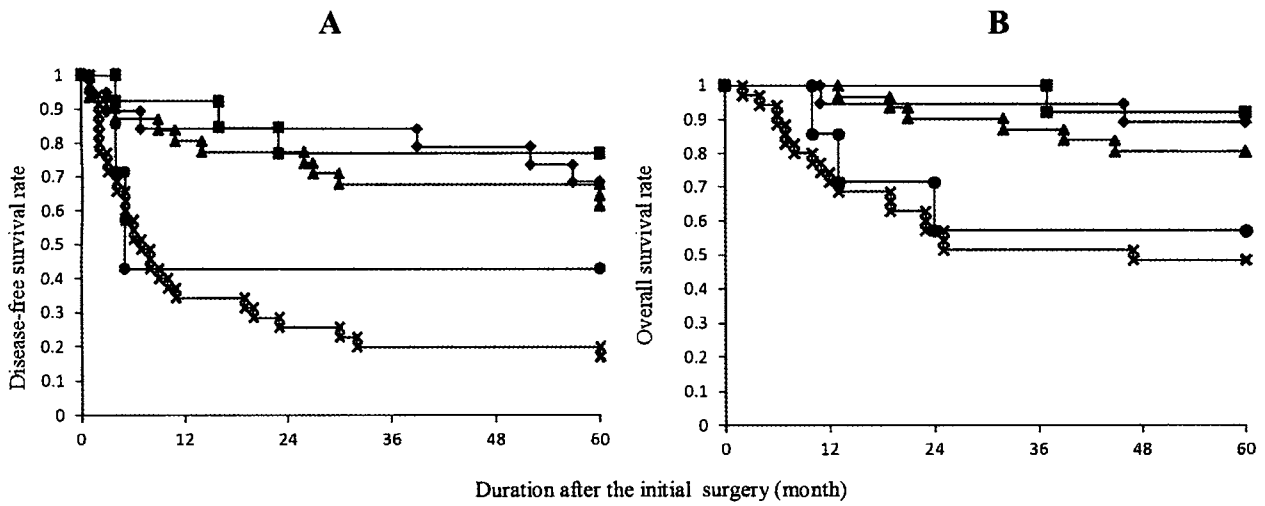


Fig. 6. Survival curves by mode of invasion. Disease-free survival rate (A) and overall survival rate (B). ■1 ◆2 ▲3 ×4 C ●4D. Disease-free and overall survival rates of tumors with grade 4C and 4D were significantly lower than those of tumors with grade 1-3 (Log-rank test).

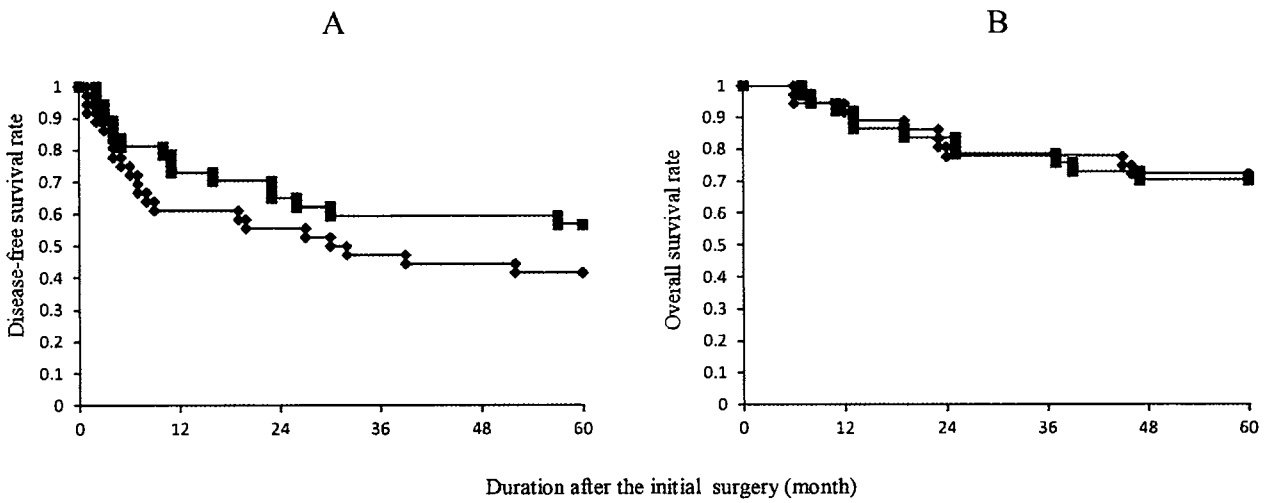


Fig. 7. Survival curves by blood vessel density. Disease-free survival rate (A) and overall survival rate (B). ■ $\lt; 35$ ◆ ≥ 35 No statistical significance was found (Log-rank test).

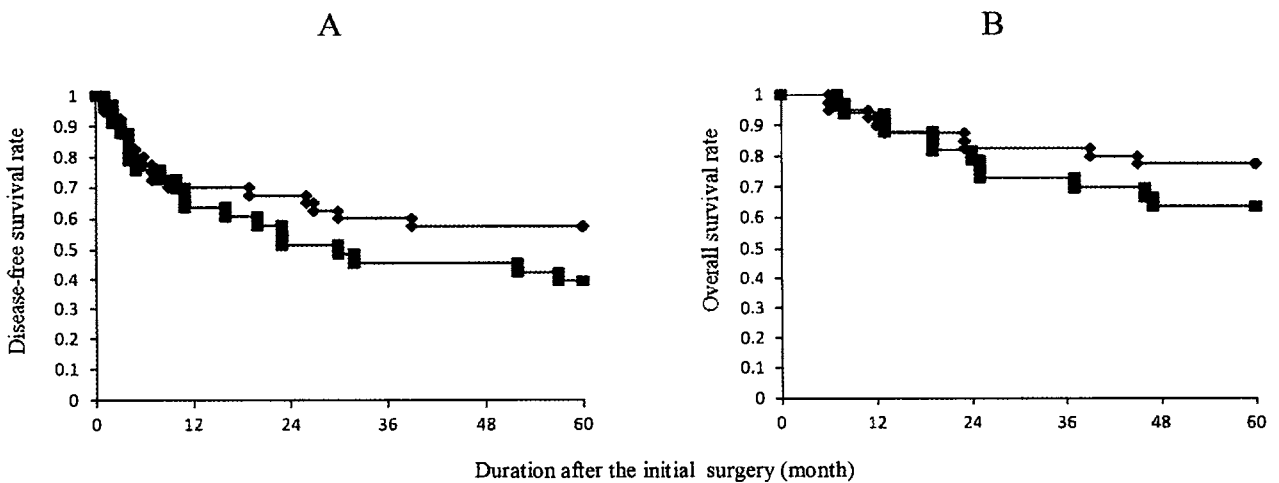


Fig. 8. Survival curve by lymphatic vessel density. Disease-free survival rate (A) and overall survival rate (B). ■ $\lt; 10$ ◆ ≥ 10 No statistical significance was found (Log-rank test).

Table 3. P-values of multiple logistic regression analysis for association of specific factors with disease free and overall survival rates

Factors	Disease free 5-year survival		Overall 5-year survival	
	OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value
Age	0.984 (0.932-1.038)	0.549	0.985 (0.927-1.047)	0.635
Gender	0.216 (0.037-1.257)	0.088	7.16 (0.725-70.600)	0.092
Smoking	0.529 (0.100-2.788)	0.453	0.688 (0.070-6.720)	0.747
Alcohol	0.928 (0.215-3.998)	0.92	1.612 (0.288-9.030)	0.587
Primary site	0.749 (0.425-1.323)	0.32	0.657 (0.298-1.446)	0.297
T	0.803 (0.49-13.265)	0.878	1.106 (0.041-29.767)	0.952
N	9.98 (0.312-3193.214)	0.193	0.948 (0.035-25.555)	0.975
Stage ^{a)}	1.77 (0.122-25.764)	0.676	0.182 (0.005-6.503)	0.351
Surgical margin	5.825 (0.934-36.320)	0.059	9.013 (0.709-114.620)	0.09
Differentiation	0.683 (0.189-2.473)	0.561	0.759 (0.143-4.029)	0.746
Mode of invasion ^{b)}	3.228 (1.478-7.047)	0.003	0.346 (0.125-0.883)	0.026
Density of blood vessels	1.003 (0.962-1.045)	0.905	0.980 (0.934-1.028)	0.413
Density of lymphatic vessels	0.98 (0.883-1.088)	0.706	0.989 (0.873-1.121)	0.863

^{a)}stage 1-3 vs stage 4. ^{b)}Grade 1-3 vs Grade 4C/4D.
OR, odds ratio; CI, confidence interval.

IV. 各因子と予後との多変量解析の結果

ロジスティック重回帰解析の結果、癌浸潤様式が予後に関連した。すなわち、癌浸潤様式の4Cもしくは4D型は1～3型に比べ5年無再発生存率、5年生存率が有意に低かった。一方、その他の因子については、5年無再発生存率、5年生存率に関係するものはなかった(表3)。

考 察

現在まで癌に対する様々な予後因子の研究が行われている。近年、免疫組織化学染色を用いた各種マーカーの発現と予後との関連に関する研究が多数報告されている^{20)~23)}。また遺伝子研究の発展とともに、患者や癌細胞の遺伝子に関する研究も増えている²⁴⁾。しかし実際の臨床の現場では、治療方針は臨床的因子やHE染色から得られる病理組織学的因子を参考に決められる。こうしたことを考慮し、本研究では臨床的な所見と標準的なHE染色所見の中で予後と強く関連する因子を調査した。また腫瘍の血管密度やリンパ管密度が予後の評価に利用できるかについても検討した。

単変量解析の結果、5年無再発生存率に対してはN因子、切除断端の状態、癌浸潤様式が、5年生存率には年齢、N因子、細胞分化度、癌浸潤様式が関係した。

臨床的因子の中で特にN因子と予後との関連性については多く報告されている。Quonら²⁵⁾は過去に発表された頭頸部扁平上皮癌の予後因子に関する論文を詳細に調査した結果、N因子が重要な予後因子の1つであると述べている。Rogersら²⁶⁾もステージとN因子が口腔癌の予後に最も相関する因子であると報告している。本研究の結果と合わせ、口腔扁平上皮癌では所属リンパ節に転移がある症例はない症例よりも予後が悪いことが再確認できた。

切除断端が陽性であった症例は陰性であった症例よりも有意に5年無再発生存率が低かった。しかし切除断端の状態は生存率に関係しなかった。このことは、切除断端陽性は再発の危険性を上げるものの生死には直結しないことを示している。切除断端陽性の再発は局所再発が多く、再手術にて癌を制御できうる症例が少なくないためと考えられる。

病理組織像から予後を推定する方法は1920年にBroders²⁷⁾が口唇癌の分化度と悪性度との相関を報告して以来多くの報告がみられる。1973年にはJakobssonら⁹⁾が、分化度、浸潤様式、細胞分裂、リンパ球浸潤など8因子をそれぞれ独自の方法で点数化する方法を報告している。その後Yamamotoら⁴⁾はJakobssonらの浸潤様式分類に従い症例を分析し、最も高悪性である4型の中にプレオマイシンに対する感受性の異なる2群を発見し、この2群の浸潤像が異なっていることから、これまでの4グレードであった浸潤様式の最も高度浸潤癌の4型を細分化した5グレードの癌浸潤様式を発表した。その後、この癌浸潤様式はリンパ節転移の頻度や予後とも相関する因子であることが多くの施設から報告され²⁸⁾²⁹⁾、日本ではこの癌浸潤様式が浸透されつつある。今回の著者の研究結果から、高度浸潤様式である4C型、4D型は1～3型と比較すると極めて高い臨床的悪性度を保有しており、再発や生存に対する危険率は非常に高いことが明らかになった。

年齢と細胞分化度は5年無再発生存率には関係しなかったが5年生存率には関係した。年齢に関しては、若年者と高齢者とは再発率に大きな差はないが、高齢者で再発した場合は再手術を含む積極的な治療が適応できない場合が多いこと、体力の点で再発に伴う合併症への抵抗力が弱いことが5年生存率に年齢が影響した理由と考

える。細胞分化度については、分化度の違いによる再発率の違いはなかったが、低分化型の再発症例では遠隔再発が多く(7人中5人)、これは中等度分化型(20人中3人)、高分化型(74人中9人)と比較しても著しく頻度が高かった。細胞分化度が5年生存率に影響したのは、低分化型の再発が遠隔部位で発生しやすいことが理由の1つと考えられる。

複数の因子が1つのアウトカムに関係しうる場合、多変量解析を行うことで各因子が相対的にどの程度寄与しているかを明らかにできる。本研究でロジスティック重回帰解析を行ったところ、癌浸潤様式が5年無再発生存率、5年生存率と関係した。この結果は、口腔扁平上皮癌の予後に最も関連性の高いのは癌浸潤様式であることを示している。一方で、癌浸潤様式と同様、N因子も単変量解析で5年無再発生存率、5年生存率への関連性を認めたが、多変量解析では有意な関連性はなかった。この点についてN因子と癌浸潤様式との関係を調査したところ、興味深い事実があった。すなわち、4Cもしくは4D型の占める割合は、N陽性症例では68%(25人中18人)であったが、N陰性症例では30%(80人中24人)のみであった。N陰性症例において、4Cもしくは4D型の75%(24人中18人)が再発したのに対し、1~3型で再発したのは32%(56人中18人)のみであった。N陽性症例において、4Cもしくは4D型の再発率は83%(18人中15人)に達し、3型の43%(7人中3人)と比較すると顕著に高かった。以上を考慮すると、予後への関連度はN因子よりも癌浸潤様式の方が強いと推察され、こうしたことが多変量解析の結果につながったと考えられる。臨床において予後を評価する上で、Nが陽性か陰性かは勿論重要であるが、浸潤様式からはそれ以上の確度の予後情報が得られると考えられる。浸潤様式の評価はHE染色による通常の病理検査項目に加えることが可能であり、治療計画の決定する際はその結果を十分に考慮すべきである。

血管新生は1970年代初めFolkman³⁰⁾が基礎研究をはじめて以来、分子レベル、細胞レベルでの解析が行われるようになってきた。その後、多くの研究者が様々な癌の転移や予後と腫瘍周囲の血管密度との関連性についての検討を行い、他臓器の癌では血管密度が増すにつれ予後が不良となることが報告されている³¹⁾。しかしながら口腔扁平上皮癌では血管密度の低い癌で転移が多くなるとの報告³²⁾もあり、血管密度と予後との関連性については未だ一定の見解は得られていない。一方、リンパ管密度に関する研究では転移や予後との関連性が認められず、観察されるリンパ管は機能していないとされてきた³³⁾³⁴⁾。しかし最近、リンパ管内皮細胞増殖因子としてのVEGF(vascular endothelial growth factor)-Cに関する研究が行われ、またリンパ管特異的マーカーとしてLYVE-1(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor)抗体、D2-40抗体が開発された³⁵⁾³⁶⁾。これらを用いリンパ管

と転移や予後との相関について最近議論されるようになってきている。しかし、同一標本上で血管とリンパ管を識別することは非常に困難である。そこで著者は各種の染色方法を検討したところ、CD34抗体とD2-40抗体を用いた二重免疫組織化学染色が血管とリンパ管を明確に識別できることを発見した。本研究では二重免疫組織化学染色法を用いて口腔扁平上皮癌患者の血管密度およびリンパ管密度を算定し予後との関係を検討した。その結果、腫瘍周囲の血管密度およびリンパ管密度はいずれも患者の予後とは関連しなかった。また正常組織と比較しても癌の脈管密度は高くはなかった。こうしたことから血管密度やリンパ管密度から予後を推察することは難しいと考えられる。一方で、血管やリンパ管は観察する部位で密度が大きく異なる場合があることや、既存の血管か新生血管かの区別が染色だけでは困難なこと³⁷⁾から、今後も詳細に検討する必要があると思われる。

以上の結果より、癌浸潤様式は口腔扁平上皮癌の予後に単に関連するだけでなく予後を評価する上で最も確度の高い情報を提供しうるということが明らかになった。したがって、治療を計画する際には、癌浸潤様式分類を利用し個々の患者にとって最適の治療を決定する必要があると考えられた。

結 論

口腔扁平上皮癌の予後と関連する因子を明らかにする目的で、臨床および病理組織学的各因子と患者の予後との関係を統計的に検討したところ、以下の結論を得た。

1. 単変量解析の結果では、5年無再発生存率にはN因子、切除断端の状態、癌浸潤様式、5年生存率には年齢、細胞分化度、N因子、癌浸潤様式が関係した。
2. ロジスティック重回帰解析結果では、癌浸潤様式が5年無再発生存率、5年生存率との有意な関連性を認めた。
3. 血管およびリンパ管を同一標本上で二重免疫組織化学染色し、その密度と予後との関係を検討した結果では、いずれの密度も5年無再発生存率、5年生存率との関連性は認められなかった。

以上の結果から、癌浸潤様式が予後を評価する因子として最も有用であることが明らかになった。口腔扁平上皮癌の治療を行う際には癌浸潤様式を参考にする必要があると考える。

謝 辞

本研究の実施の機会を与え、ご指導戴いた金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん細胞学講座細胞浸潤学分野(歯科口腔外科学)山本悦秀名誉教授および川尻秀一教授に深謝の意を表します。また研究の遂行に協力頂いた著者の在籍教室の各位に感謝します。

文 献

- 1) 右近亮子, 山下住雄, 他. 過去10年間の顎口腔領域悪性腫瘍の臨床統計. 日口腫瘍誌14: 37-43, 2002.
- 2) 川尻秀一, 山本悦秀. 口腔扁平上皮癌の多彩な浸潤像と

生物学的性状. 十全医会誌 118: 154-158, 2009

3) UICC: TNM classification of malignant tumors, Edited by L. H. Sobin, M. Gospodarowicz, C. Wittekind. 7th ed. Wiley-Blackwell New York, P25-29, 2009

4) Yamamoto E, Kohama G, Sunagawa H, Iwai M, Hiratsuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 51: 2175-2180, 1983

5) Jakobsson PA, Enoroth CM, Killander D, Moberger G, Mårtensson B. Histological classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 12: 1-8, 1973

6) Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg* 6: 938-947, 1984

7) Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* 184:119-122, 1998

8) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 340: 145-146, 1992

9) Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. *Cancer* 73: 678-687, 1994

10) Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 55: 371-374, 1993

11) Wong YK, Liu CJ, Kwan PC, Chao SY. Microvascular density and vascular endothelial growth factor immunoreactivity as predictors of regional lymph node metastasis from betel-associated oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 1257-1262, 2003

12) Kademani D, Lewis JT, Lamb DH, Rallis DJ, Harrington JR. Angiogenesis and CD34 expression as a predictor of recurrence in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 1800-1805, 2009

13) Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I. Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 110: 1287-1294, 2007

14) Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. *Head Neck* 19: 276-280, 1997

15) Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 101: 973-978, 2004

16) Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Martín-Villar E, Quintanilla M, Gamallo C. Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 100: 553-560, 2004

17) 日本口腔腫瘍学会編：口腔癌取扱い規約2010年1月。第1版, 金原出版, 東京, 2010

18) Wahi PN, Cohen B, Luthra UK, Torloni H. Histological typing of oral and oropharyngeal tumours. Geneva: World Health Organization; 17, 1971

19) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991

20) Kitahara H, Kawashiri S, Kato K. Immunohistochemical expressions of E-cadherin and β -catenin correlate with the invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg* 1: 28-34, 2008

21) Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, Garrod DR. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behavior. *J Pathol* 184: 369-381, 1998

22) Ohara T, Kawashiri S, Tanaka A. Integrin expression levels correlate with invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 15: 429-436, 2009

23) Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 31: 1346-1353, 2009

24) Kondoh N, Ishikawa T, Ohkura S, Arai M, Hada A, Yamazaki Y, Kitagawa Y, Shindoh M, Takahashi M, Ando T, Sato Y, Izumo T, Hitomi K, Yamamoto M. Gene expression signatures that classify the mode of invasion of primary oral squamous cell carcinomas. *Mol Carcinog* 47: 744-756, 2008

25) Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 23: 147-159, 2001

26) Rogers SN, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Magennis P, Shaw RJ, Sutton D, Errington D, Vaughan D. Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncol* 45: 201-211, 2009

27) Broders AC. Squamous cell carcinomas of the lip. – A study of five hundred and thirty seven cases –. *JAMA* 74: 656-664, 1920

28) Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T. Risk factors for late cervical lymph node metastasis in patients with stage I or II carcinoma of the tongue. *Head Neck* 24: 731-736, 2002

29) Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 34: 329-333, 2005

30) Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43: 175-203, 1985

31) Igarashi M, Dhar DK, Kubota H, Yamamoto A, El-Assal O, Nagasue N. The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 82: 1225-1232, 1998

32) Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma; A clinical-pathologic correlation. *Head Neck* 19: 276-280, 1997

33) Dumont AE. Factor VIII-related antigen. *J Nat Cancer Inst*

85: 674-676, 1993

34) van Netten JP, Cann SA, van der Westhuizen NG. Angiogenesis and tumor growth. *N Engl J Med* 334: 920-921, 1996

35) Banerji S, Ni J, Wang S, Clasper S, Su J. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144: 789-801, 1999

36) Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 82: 1255-1257, 2002

37) Nakaya H, Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Kato K, Hase T, Yamamoto E. Influences of angiogenesis and lymphangiogenesis on cancerous invasion in experimentally induced tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med* 33: 87-92, 2005

Assessment of prognostic factors of oral squamous cell carcinoma – impact of mode of invasion and tumor’s vascular density on prognosis Ayako Okamune, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Cancer Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 *Juzen Med. Soc.*, **120**, 138 – 147 (2011)

Key words oral squamous cell carcinoma, prognosis, mode of invasion, density of blood vessels, density of lymphatic vessels

Abstract

Assessment of the biological characteristics of the individual tumor is important in deciding treatment plans in oral squamous cell carcinoma. It has been reported that the pathological mode of invasion can be used to predict the clinical malignancy of a tumor. Moreover, it has been suggested that the vascular density in the tumor, which could reflect the level of angiogenesis, is correlated with the prognosis. This study determined the impact of clinical and histopathological factors on the prognosis of oral squamous cell carcinoma. The data of a total of 105 patients who underwent curative surgical treatment for primary oral squamous cell carcinoma were statistically analyzed. The factors that were analyzed included age, gender, smoking history, alcohol consumption, primary site, T stage, N stage, grade of differentiation, mode of invasion, status of surgical margin, and blood and lymph vascular densities in tumor. The patients’ outcome was discussed with 5-year disease-free survival rate (the percentage of patients that are alive 5 years with no experience of recurrence after the initial operation) and overall 5-year survival rate (the percentage of patients who lived at least 5 years after the initial operation). The results of univariate analysis exhibited that a positive surgical margin, involvement of regional lymph nodes, and mode of invasion grade 4C or 4D significantly reduced the disease-free 5-year survival rate. Age, cellular differentiation, status of regional lymph nodes, and mode of invasion were statistically related to overall 5-year survival rate. However, multiple logistic regression analysis demonstrated that only the mode of invasion was associated with disease-free and overall 5-year survival rates. The vascular density (blood and lymphatic vessels) in the tumor was not associated with the prognosis. The results of this study highlight that mode of invasion is the most important factor in predicting the outcome of oral squamous cell carcinoma.