

下顎歯肉扁平上皮癌における腫瘍細胞の計量形態学的検討

中 條 哲 子

Study of morphometric analysis of squamous cell carcinoma of lower gingiva

Tetsuko Nakajo

(平成 8 年 3 月 14 日 受付)

1. 緒 言

下顎歯肉扁平上皮癌の悪性度を把握することは、予後を推定し、適切な治療法を選択し、その後の経過観察をしていく上できわめて重要である。従来病理組織学的悪性度と予後との関連を検討した報告は数多くあるが¹⁻⁸⁾、これらは主に細胞の集団としての特性を検討したものが多く、個々の細胞の特性を検討したものは少ない。またこれらの大部分は、DNA Ploidy pattern やフローサイトメトリーを利用した研究⁹⁻¹¹⁾を除いて、主観的に検討されたものが多い。

そこで我々は、下顎歯肉扁平上皮癌を個々の細胞学的側面から客観的に検討するために、計量形態学を用いて細胞の核面積、周長、形状係数を測定し、これらのパラメーターを用いることによって良性・悪性の判定が可能かどうか、また悪性度の評価が可能かどうかの検討を行った。

2. 対象と方法

1975年3月から1988年12月までに当科を受診した下顎歯肉扁平上皮癌一次症例のうち、根治治療を行い、また生検標本において解析に必要な腫瘍細胞の観察が十分に行えた26症例を対象として、以下のように分類した。

- (A) 歯肉癌群 26症例
 - (a) 再発転移群 8症例
 - (b) 非再発転移群 18症例
- (B) 正常群 (正常コントロール) 5症例

ホルマリン固定後、パラフィン包埋、ヘマトキシリ

ンエオジン染色した生検標本を用いて画像解析を行った。画像解析は日本光学製の半定量画像解析装置 Cosmozone-ISA を用いた。生検標本の顕微鏡像はアナログデジタル変換されて PC9801 パーソナルコンピュータのモニタースクリーン上に投影され、その投影された細胞の核面積、周長、形状係数をデジタイザーを用いて測定した (最終倍率は1570倍)。ここで形状係数は評価したい細胞の周長を L、面積を S とすると次の式にて算出される係数である。

$$\text{形状係数} = L / (4 \times \pi \times S)^{1/2}$$

判別分析はまずこれら3つのパラメーター、核面積、周長、形状係数とそれぞれの変動係数 CV の合計6種の変数を用いて、変数増減法により再発転移群、非再発転移群を最もよく判別するように変数選択を行った。次いで選択された3つの変数、核面積、周長、形状係数の CV を用いて正常群と歯肉癌群との判別を行った。更に再発転移群と非再発転移群の2群間を判別する線形判別式を求めた。また求めた線形判別式の妥当性を検討するために、1989年1月から1991年5月までに当科を受診した下顎歯肉扁平上皮癌一次症例のうち、根治治療を行い生検標本で腫瘍細胞の観察が十分に行えるもの8例 (再発転移群1例、非再発転移群7例) を対象として同様な測定を行い検討した。判別分析は田中らのソフトウェア¹²⁾を用いた。

尚、1つの切片上の視野間の変動は Tosi ら¹³⁾ による一元配置分散分析を用いて検討したが、差は認められなかった。また測定に必要な細胞数の決定は、Baak ら¹⁴⁾ の running mean method を用いて検討し、細胞数100個で評価は可能であったが、本研究では1標本当たり150個の細胞について測定を行った。グループ間の変数の有意差検定は Student t 検定を用いた。

3. 結 果

正常群、歯肉癌群（再発転移群、非再発転移群）の核面積、周長、形状係数およびそれぞれの CV の平均と標準偏差の結果を表 1 に示す。正常群と歯肉癌群間では形状係数の CV を除いて面積、周長、形状係数、面積の CV、周長の CV とともに t-検定にて有意差 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) が認められた。しかしながら非再発転移群と再発転移群間では面積以外のいずれのパラメーターでも単独では有意差は認められなかった。

そこでこれら 6 つのパラメーターを用いてどのパラメーターが最も非再発転移群と再発転移群の間の判別に有用か変数増減法を用いて判別分析を行ったところ、周長、面積、形状係数の CV の 3 つのパラメーターが判別に寄与するものとして選択された (ウィルクスの $\Lambda = 0.7167$)。

これら 3 つのパラメーターを用いて正常群と歯肉癌群を判別する線形判別式を求めると、

$$\text{判別式} = -2.892 \times (\text{面積}) + 13.23 \times (\text{周長}) - 445.5 \times (\text{形状係数の CV}) - 182.4$$

であり、判別式の値が正の時に歯肉癌群と判別し、負の時に正常群と判別する。この判別式を用いた判別結果を表 2 に示す。歯肉癌群 26 例中 25 例 (96.2%) は癌と判別され、正常 5 例は 5 例 (100.0%) とともに正常と判別され、その正判別率は 96.8% であった。

次いでこれら 3 つのパラメーターを用いて非再発転移群と再発転移群の間の判別を行った。

得られた線形判別式は、

$$\text{判別式} = -1.403 \times (\text{面積}) + 6.169 \times (\text{周長}) - 240.8 \times (\text{形状係数の CV}) - 84.612$$

で、判別式の値が正の時再発転移群と判別し、負の時非再発転移群と判別する。この判別式を用いた判別結果を表 3 に示す。非再発転移群 18 例中 13 例 (72.2%) は非再発転移群と判別、再発転移群 8 例中 6 例 (75.0%)

表 1 6 つの変数の平均と標準偏差

面積	35.786 ± 3.845	(正常群)	**
	60.968 ± 10.712	(歯肉癌群)	**
	59.268 ± 11.610	(非再発転移群)	*
	64.793 ± 7.636	(再発転移群)	*
周長	22.042 ± 1.342	(正常群)	**
	28.877 ± 2.529	(歯肉癌群)	**
	28.386 ± 2.716	(非再発転移群)	
	29.983 ± 1.706	(再発転移群)	
形状係数	1.046 ± 0.011	(正常群)	*
	1.056 ± 0.015	(歯肉癌群)	*
	1.053 ± 0.011	(非再発転移群)	
	1.061 ± 0.022	(再発転移群)	
面積の CV	0.0893 ± 0.0239	(正常群)	*
	0.2496 ± 0.0499	(歯肉癌群)	*
	0.2508 ± 0.049	(非再発転移群)	
	0.2469 ± 0.055	(再発転移群)	
周長の CV	0.0893 ± 0.0239	(正常群)	*
	0.1271 ± 0.0221	(歯肉癌群)	*
	0.1265 ± 0.023	(非再発転移群)	
	0.1284 ± 0.022	(再発転移群)	
形状係数の CV	0.0309 ± 0.0158	(正常群)	
	0.0344 ± 0.0076	(歯肉癌群)	
	0.0340 ± 0.0070	(非再発転移群)	
	0.0356 ± 0.0091	(再発転移群)	

** : $P < 0.01$ * : $P < 0.05$

Student t-検定

表2 正常群と歯肉癌群の判別結果

実際の群	判別された群		総計
	正常群	歯肉癌群	
正常群 (%)	5 (100.0)	0 (0.0)	5 (100.0)
歯肉癌群 (%)	1 (3.8)	25 (96.2)	26 (100.0)

正判別率=96.8%

表3 再発転移群と非再発転移群の判別結果

実際の群	判別された群		総計
	再発転移群	非再発転移群	
再発転移群 (%)	6 (75.0)	2 (25.0)	8 (100.0)
非再発転移群 (%)	5 (27.8)	13 (72.2)	18 (100.0)

正判別率=73.1%

は再発転移群と判別され、正判別率は73.1%であった。この線形判別式の妥当性を検討するために、新たな再発転移例1例、非再発転移例7例について同様に測定を行い、上記判別式を用いて判別分析を行った。再発転移例1例は再発転移群と判別、非再発転移群7例中5例(71.4%)は非再発転移群と判別され、その正判別率は75.0%であった。結果を表4に示す。

表4 線形判別式の妥当性の検討

実際の群	判別された群		総計
	再発転移群	非再発転移群	
再発転移群 (%)	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
非再発転移群 (%)	2 (28.6)	5 (71.4)	7 (100.0)

正判別率=75.0%

4. 考 察

下顎歯肉扁平上皮癌の悪性度の指標については、臨床、病理の面から多くの検討が加えられている¹⁻⁸⁾。しかし、いずれも細胞の集団としての特性を検討したもので、個々の細胞の特性すなわち核異型度や核の形状の面から検討したものは少ない。

そこで我々は、下顎歯肉扁平上皮癌の生物学的性状を個々の細胞学的側面から客観的に検討するために計量形態学を用いた。

歯肉癌群と正常群とは、細胞の核面積、周長は1%

形状係数は5%の危険率で有意差が認められた。すなわち、これらパラメーターを用いることにより個々の細胞の形状による癌と正常例の鑑別は可能である。しかし、臨床上当て問題となる再発・転移に関しては、これら個々のパラメーターだけでは鑑別は困難である。そのため、これらのパラメーターを組み合わせ用いて歯肉癌群の再発転移群と非再発転移群の鑑別が可能かどうかの検討を行った。すなわち、細胞の核面積、周長、形状係数およびそれぞれのCVの合計6つのパラメーターを用いて、変数増減法によりこれら2群の判別に最も寄与するパラメーターの検討を行った。

再発転移群と非再発転移群の鑑別に最も寄与するパラメーターは、核面積、周長および形状係数のCVであった。

Baakら¹⁵⁾は、細胞の核面積は子宮頸部上皮内癌、鼻咽頭癌、胃癌、膀胱癌、甲状腺癌症例について、境界領域病変での判別に寄与する因子であると報告している。また、Tosiら¹³⁾は核面積は腎癌の予後を決める因子であると報告している。一方糸井ら¹⁶⁾は、胃癌症例で核DNA量と核面積とは正の相関があり、核面積が増せば核DNA量も増加することを報告し、Holmら¹⁷⁾も頭頸部の扁平上皮癌で核DNA量は予後と関係あることを指摘している。また木下ら¹⁸⁾は、口腔癌とその境界領域病変で核面積と核DNA量はリンパ節転移や予後の指標となり得ると指摘している。

形状係数については、乳癌症例でTamuraら¹⁹⁾が5年生存率に寄与する因子であると報告している。

周長についても甲状腺癌で予後との関係がBaakら¹⁵⁾により報告されている。

このように、これまで種々の癌において境界領域病変での判別に寄与する因子であり、かつ予後と関係のある因子であると報告された核面積、周長および形状係数は下顎歯肉扁平上皮癌においても境界領域病変での判別に寄与しているといえる。核面積、周長および形状係数のCVを用いた判別式により、歯肉癌群は26例中25例(96.2%)が癌と判別され、正常群5例は全症例正常と判別された。歯肉癌群のうち癌と判別されなかった1例は最初の病理検査時に癌との確定診断がつかず経過観察された症例である。また予後との関係については、この3変数を用いた判別式により、再発転移群8例中6例(75.0%)は正しく再発転移群と判別され、非再発転移群18例中13例(72.2%)も正しく非再発転移群と判別された。その後の検討例でも正判別率は75.0%とほぼ同じ値を示したことは、得られた判別式の妥当性を示すものと考えられる。すなわち、下顎歯肉扁平上皮癌において個々の細胞の形態学的計測、特に核面積、周長および形状係数のCVの測定は

正常群と歯肉癌群との鑑別のみでなく、再発・転移等の予後を推定する悪性度の指標となり得ると考えられ、臨床上有用と考えられた。

5. 結 論

歯肉癌群（再発転移群，非再発転移群）および正常群について，個々の細胞の核面積，周長，形状係数の形態学的計測を行い，これらのパラメーターが悪性度の検討に有用かどうか検討し以下の結果を得た。

1. 核面積，周長，形状係数の CV が悪性度の評価に最も寄与していた。

2. 歯肉癌群と正常群とを判別する線形判別式を下に示す。

$$\text{判別式} = -2.892 \times (\text{面積}) + 13.23 \times (\text{周長}) - 445.5 \\ \times (\text{形状係数の CV}) - 182.4$$

判別式 > 0 : 歯肉癌群

判別式 < 0 : 正常群

正判別率 96.8%

3. 再発転移群と非再発転移群とを判別する線形判別式を下に示す。

$$\text{判別式} = -1.403 \times (\text{面積}) + 6.169 \times (\text{周長}) - 240.8 \\ \times (\text{形状係数の CV})$$

判別式 > 0 : 再発転移群

判別式 < 0 : 非再発転移群

正判別率 73.1%

4. 求めた線形判別式を用いて新たな症例について判別分析を行ったところ再発転移群100%，非再発転移群71.4%が正しく判別され，正判別率75.0%であった。

5. 以上より核面積，周長，形状係数の CV は悪性度の客観的な指標になり得ると考えられた。

従来の臨床，病理学的な検索にこれらの細胞学的情報を加えることにより予後を予測し，より適切な治療を行うことができると考えられる。

文 献

- 1) Broders, A.C.: Squamous cell epithelioma of the lip. A study of five hundred and thirty seven cases. *J. Am. Med. Assoc.* 74, 656-664, 1920.
- 2) Jakobsson, P.A., Eneroth, C.M., Killander, D., Moberger, G. and Martensson, B.: Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiologica* 12, 1-8, 1973.
- 3) Willen, R., Nathanson, A., Moberger, G. and Anneroth, G.: Squamous cell carcinoma of the gingiva. Histological classification and grading of malignancy. *Acta Otolaryngol* 79, 146-154, 1975.
- 4) 佐野和生, 井口次夫, 中村仁昭, 北村 晃, 佐々木元賢, 高橋 弘: 口腔領域扁平上皮癌の臨床病理学的観察—組織像と予後との関連を中心として—. *日口外誌*, 31, 1-9, 1985.
- 5) 立花忠夫: 口腔領域扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に関する臨床的ならびに病理組織学的研究, *口病誌* 52, 521-544, 1985.
- 6) 嶋田 誠, 篠原正徳, 竹之下康治, 阿部喜八郎, 久保敬司, 岡増一郎: 口腔領域扁平上皮癌の臨床的・病理組織学的検討. *日口外誌* 36, 667-673, 1990.
- 7) 梅田正博, 大森昭輝, 横尾 聡, 寺延 治, 中西孝一, 島田桂吉: 口腔扁平上皮癌の頸部後発転移に関する臨床病理学的研究. *日口外誌* 37, 143-151, 1991.
- 8) 今井 裕, 佐々木忠昭, 鈴木忠昌, 永島知明, 岡部清幸, 篠原 真, 藤田高志, 似内一郎, 細谷玲子, 横倉幸弘, 坂元晴彦, 朝倉昭人: 顎口腔領域扁平上皮癌の臨床病理学的検討. *日口外誌* 38, 450-455, 1992.
- 9) Chen, R.: Flow Cytometric Analysis of Benign and Malignant Tumors of the Oral and Maxillofacial Region. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 47, 596-606, 1989.
- 10) Tytor, M., Franzen, G., Olofsson, J., Brunk, U. and Nordenskjold, B.: DNA content, malignancy grading and prognosis in T1 and T2 oral cavity carcinomas. *Br. J. Cancer* 56, 647-652, 1987.
- 11) 岡 茂, 和田安弘, 山崎典子, 山下敏夫, 熊沢 忠, 河本圭司: フローサイトメトリーを用いた頭頸部腫瘍悪性度診断—異数倍数体による評価—. *癌の臨床* 35, 653-658, 1989.
- 12) 田中 豊, 垂水共之, 脇本和昌編: パソコン統計解析ハンドブック多変量解析編. 共立出版株式会社, 東京, 71-137, 1984.
- 13) Tosi, P., Luzzi, P., Baak, J., Miracco, C., Santopietro, R., Vindigni, C., Mattei, F., Acconcia, A. and Massai, M.: Nuclear Morphometry as an Important Prognostic Factor in Stage I Renal Cell Carcinoma. *Cancer* 58, 2512-2518, 1986.
- 14) Baak, J., Dop, H., Kurver, P. and Hermans, J.: The Value of Morphometry to Classic Prognosticators in Breast Cancer. *Cancer* 56, 374-382, 1985.
- 15) Baak, J., Oort, J.: A Manual of Morphometry in Diagnostic Pathology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 62-77, 1983.
- 16) 糸井啓純, 芦原 司: 癌細胞の機能・形態の同時定量解析. *医学のあゆみ* 147, 583-586, 1988.
- 17) Holm, L.E.: Cellular DNA amounts of squamous cell carcinoma of the head and neck region in relation to prognosis. *Laryngoscope* 92, 1062-1069, 1982.
- 18) 木下勲彦: 口腔癌とその境界病変の細胞化学的

診断基準と悪性度の指標について. 口科誌 37, 1081-1102, 1988.

19) Tamura, G., Masuda, T.: Karyometric and DNA

Content Analyses of Cancer Cells in Stage III Breast Cancer with Reference to Prognosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 20, 78-82, 1990.