

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791981

研究課題名 (和文) 口腔粘膜悪性境界病変の診断への NBI の応用と上皮内血管配置の病理組織学的裏付け

研究課題名 (英文) The relationship of intraepithelial blood vessels and NBI system in oral borderline malignancies.

研究代表者

船山 昭典 (FUNAYAMA AKINORI)

新潟大学医歯学総合病院・医員

研究者番号：80529686

研究成果の概要 (和文)：口腔粘膜異型境界病変 (異型上皮、上皮内癌) の上皮内に配置する異常血管 (上皮内血管) を免疫組織学的に明らかにし、病変レベルごとに比較検討したところ、上皮内癌で有意に多く認められた。また、血管を評価することでその有用な診断を行うことができる NBI を口腔癌の診断、切除範囲の決定に応用し、切除標本の病理組織学的所見と対比させることで、口腔領域の診断においても有用な手法であることが判明した。

研究成果の概要 (英文)：Blood capillary vessels within the epithelial zone (IEBVs) of oral borderline malignancies including epithelial dysplasia and carcinoma in-situ (CIS) were examined by immunohistochemistry for CD31 and type IV collagen. IEBVs increased in number significantly in CIS. It was revealed that narrow band imaging (NBI), that is established to visualize abnormal microvascular patterns was a effective tool for differential diagnosis of oral borderline malignancies and decision of a adequate safety margin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学、口腔粘膜悪性境界病変、上皮内癌、上皮内血管、NBI

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を背景に、口腔癌とりわけ、扁平上皮癌の発生率は経年的に増加してきている。多くの扁平上皮癌では、その発生様式が de novo 発生よりも周囲に上皮内癌または異型上皮を背景に発生するシークエンス癌が多数を占めるといわれている。口腔癌はその口腔という発生部位的から肉眼で直視できるため、早期発見が可能で、浸潤癌へと進行する以前の上皮内癌または異型上皮の

段階で発見できると信じられている。しかし、現実には、口腔癌切除時に十分な安全域を設定しても、その後の病理組織学的検査では切除断端に異型上皮ないし上皮内癌の残存がある場合が多いという現実がある。それは最近の病理組織学的検討で判明しているように、癌周囲に広範な前癌病変が存在しているためである。現在、切除範囲の設定は、口腔腫瘍学会が推奨するヨード生体染色による不染域を含むように設定しているが、術中迅

速診断では、その断端に上皮内癌等が残存していることが判明し、追加切除を余儀なくされる場合がある。すなわち、臨床肉眼的には再現性のある切除範囲の決定は困難なのである。しかし、切除断端の病理学的評価はその後の治療や予後に大きな影響を与える重要な因子であるため、切除範囲の設定精度の改善は口腔癌治療における急務となっている。そこで、本研究では、切除範囲の設定に、食道や気道の表在性癌の診断と治療に近年導入されて、その効果が高いと評価されている狭帯域フィルター内視鏡 (narrowbanding image, NBI) を口腔にも適用することを計画した。NBI 法の原理は、青色光によって赤血球ヘモグロビンを検出することにより、粘膜内血管を表面から観察するというもので、その血管形態と血管密度を描出することで、切除対象となる上皮内腫瘍を中心とした表在性癌の範囲が色調の異なる brownish area として検出するというものである。近年、口腔粘膜上皮内癌の病理組織学的診断基準のひとつとして、血管ならびにリンパ管の配置を指標にすることを提案してきた。とくに、上皮層内に取り込まれ、孤立した様相の<上皮内血管>は上皮内癌で増加することを確認してきた。上記の NBI を用いれば病変部を色で識別できるという臨床に直結した結果が得られる可能性が高いと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず病理組織学的に血管に対する免疫組織化学をおこない、上皮内血管の口腔粘膜悪性境界病変 (正常上皮、異型上皮、上皮内癌、) の病変レベルごとの特徴を明らかにする。すなわち、上皮内癌において上皮内血管を評価することで、その診断が可能かどうかを調査する。

次に、正常口腔粘膜に対し NBI を用い、その画像を調査し、コントロールとして用い、口腔悪性病変との画像を比較対比することで、口腔悪性境界病変が NBI で診断可能かどうかを評価する。これと、同時に、病理組織学的に評価した、上皮内血管と、NBI 画像との関連を見だし、NBI 所見と組織学的データを比較検討し、NBI の口腔粘膜悪性境界病変への応用を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 口腔粘膜血管網ならびに上皮内血管の免疫組織学的描出

すでに切除され、診断済みの口腔癌を中心とする口腔粘膜悪性境界病変の生検・外科切除材料のパラフィンブロックおよび正常粘膜試料から連続切片を作製し、血管を描出する目的で、血管内皮マーカーとして CD31、基底膜マーカーとして IV 型コラーゲンのそれぞれの免疫組織化学をおこなった。これによって明瞭に描出される血管を正常上皮、異型上皮、上皮内癌、初期浸潤癌ごとに以下に記

述するそれぞれの計測を実施した。

(2) 口腔粘膜上皮内血管の数量的解析および口腔粘膜形態の解析

口腔粘膜上皮の病変カテゴリーごとに、免疫組織化学的に描出された上皮内血管の粘膜上皮単位幅 (1 mm) あたりの数を計測する。さらに、上皮内血管の上皮表面からの距離 (A)、設定した単位幅あたりの上皮厚さ (B、C)、上皮基底膜周長、上皮内血管の上皮層相対位置 (A/B)、および上皮表層から釘脚基部までの距離 (D) を測定し、さらに上皮伸長率 (D/B) を算出する。これらの計測値、算出値を上皮病変カテゴリー間で比較検討する。この結果から、詳細な各病変間での上皮形態の分析が可能となり、この上皮形態が NBI の血管検出感度に影響するかどうかを検討した。(Fig.1)

(3) NBI 拡大内視鏡による正常口腔粘膜血管パタンの認識

有志の協力を得て、口腔粘膜の各部位別の正常粘膜の NBI 拡大内視鏡所見をデジタル映像として保存し、それらのパタンを解析した。部位は、舌縁、舌下面、舌背、頬粘膜、口腔底、歯肉、口蓋とした。

(4) 正常口腔粘膜の血管網

正常粘膜試料およびの口腔粘膜悪性境界病変、浸潤癌の観察計測結果、NBI 拡大内視鏡で観察される血管と生検・外科材料で切除した組織との対応をおこない、血管走行と配置を決定する。悪性境界病変の各カテゴリーごとの上皮内血管配置様式を決定し、上皮内血管、および上皮釘脚形態と、NBI 画像との整合性を確立する。

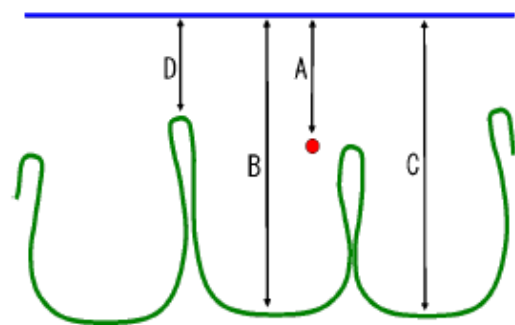


Fig.1

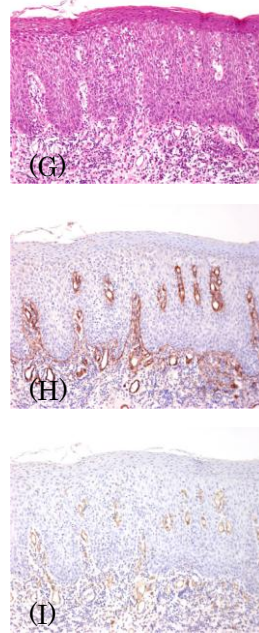
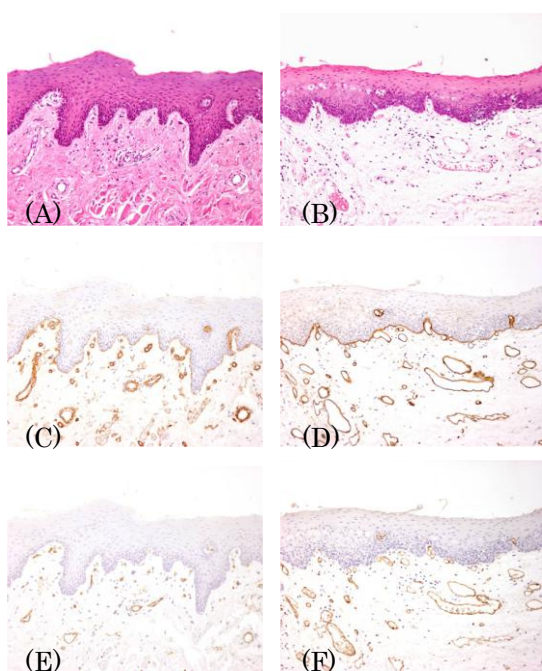
## 4. 研究成果

(1) 上皮内血管および口腔粘膜形態の解析

56 症例の生検または切除標本を検討した。同標本において上皮内癌 36 領域、中等度異型上皮 33 領域、正常口腔粘膜上皮 15 領域について評価し、粘膜上皮単位幅 (1mm) あたりの平均を求めた。60 倍視野において、イメージ解析ソフト FLVFS-LS (Olympus) を使用した。CD31 および、IV 型コラーゲンの面積組織化学により、上皮層内に位置する上皮内血管の検

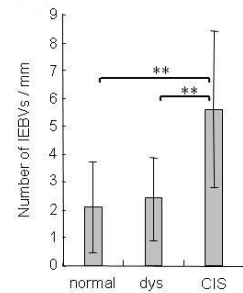
出明瞭であった。

正常上皮、異型上皮においては、上皮内血管は散見されるものの、血管周囲には結合組織の取り巻きが見られ、いわゆる、上皮釘脚のクロスカットと見なすことができた。一方、上皮内癌においては、上皮内の血管数は正常上皮および異型上皮と比較し、明らかにその数が多く、また上皮に対して垂直方向に進入し、周囲の結合組織は上皮の増殖による圧排で認められず、あたかも血管と上皮が接しているように確認できた (Fig.2)。上皮内血管は、正常上皮  $2.1 \pm 1.6$ 、異型上皮  $2.4 \pm 1.5$ 、上皮内癌  $5.6 \pm 2.8$  で、有意差を持って上皮内癌で多いことが示された (Fig.3)。上皮内血管の上皮表層からの距離 (A) は正常上皮、異型上皮、上皮内癌において、それぞれ、平均  $318 \mu\text{m}$ 、 $104 \mu\text{m}$ 、 $192 \mu\text{m}$  であった。上皮の厚さ (B, C) はそれぞれ、平均  $641 \mu\text{m}$ 、 $237 \mu\text{m}$ 、 $491 \mu\text{m}$  であった。上皮内血管の上皮層相対位置 (A/B) は正常上皮、異型上皮、上皮内癌において、それぞれ、 $0.5$ 、 $0.43$ 、 $0.38$  と上皮内癌において最小であり、つまり、上皮内血管の上皮に対する相対的な位置は上皮内癌でもっとも最小と考えられた。上皮伸長率 (D/B) は正常上皮、異型上皮、上皮内癌において、それぞれ、 $0.63$ 、 $0.63$ 、 $0.62$  であった。粘膜上皮単位幅 (1 mm) あたりの上皮釘脚周長は正常上皮、異型上皮、上皮内癌でそれぞれ、 $2.6\text{mm}$ 、 $1.4\text{mm}$ 、 $2.3\text{mm}$  であった。



**Fig.2**  
 正常上皮 : (A),(C),(E)  
 異型上皮 : (B),(D),(F)  
 上皮内癌 : (G),(H),(I)

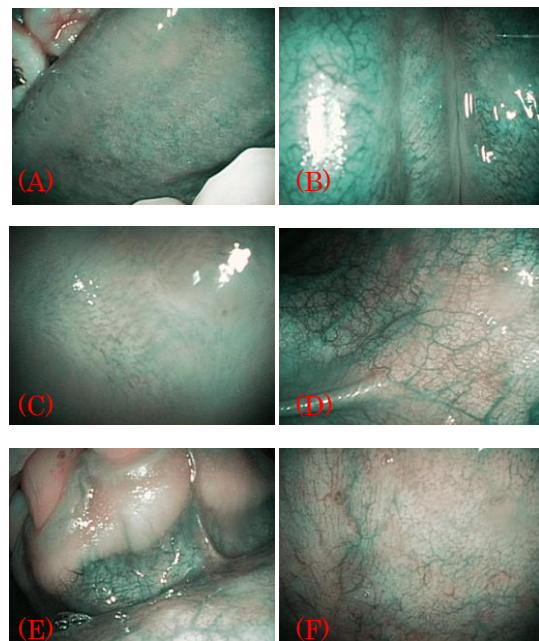
HE : (A),(B),(G)  
 IV型コラーゲン :  
 (C),(D),(H)  
 CD31 : (E),(F),(I)



(Fig.3)

(2)NBI による正常口腔粘膜の評価

舌縁, 舌下面, 頬粘膜, 口底, 歯肉, 硬口蓋, 軟口蓋の部位別検討をおこなった。各部位において粘膜に横走する微少血管および、粘膜に垂直に走り、上皮釘脚間でループを描くドット状の緑色斑点が規則的かつ明瞭に描出できたが、角化の強い硬口蓋および歯肉 (付着歯肉) においては、血管の描出は一部不明瞭であった。血管の走行は均一でその太さも一様であった (Fig.4)





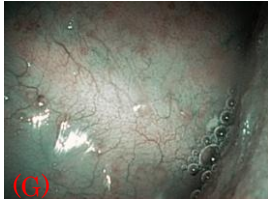


Fig.4

(A): 舌縁, (B): 舌下面, (C): 頬粘膜, (D): 口底, (E): 歯肉, (F): 硬口蓋, (G): 軟口蓋

(3)扁平上皮癌部および悪性境界病変の NBI 所見と病理組織像との関連について

①右側舌縁部に生じた初期浸潤癌

肉眼所見および拡大内視鏡の所見では、表面は白色でやや顆粒状、周囲との境界は不明瞭で硬結は触れなかった (Fig.5A)。NBI 所見は周囲にはドット状の毛細管ループは確認できるが、病変部においては、同様の所見は見られず、brownish area は一部に認められた (Fig5B, C)。病変からドット状の毛細管ループの確認できた 10mm の安全域を設定し全摘生検術を施行した。病変部が白色を呈し、病理組織学的には、粘膜の肥厚 (癌細胞による肥厚) と角化の亢進が認められたために光源が上皮内血管をとらえられなかったと考えられたが、一部粘膜肥厚の存在しない部位において brownish area が認められたと考えられた。病理組織診断は高分化型扁平上皮癌で、切除断端の評価は正常粘膜もしくは軽度異型上皮の診断であった。

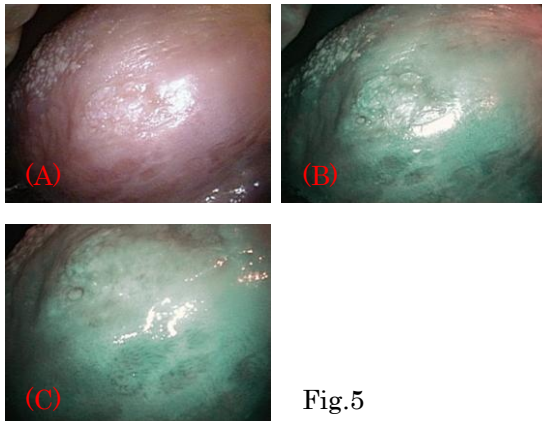


Fig.5

②右側舌縁部に生じた進行癌

肉眼所見および拡大内視鏡の所見では、表面は凹凸不整で一部潰瘍状、周囲との境界は不明瞭で高度の硬結を触れ、深部に深く浸潤した症例 (Fig.6A, B, C) である。NBI 所見は病変部においては、brownish area が明瞭に認められた。さらに同部位に不規則に走行する茶色および緑に描出される血管を確認、正常上皮と比較し、血管の太さは不均一であった (Fig6D, E, F, G)。病変からドット状の毛細管ループの確認できた 10mm~15mm

の安全域を設定し切除術を施行した。病理組織診断は高分化型扁平上皮癌で、切除断端の診断は軽度異型上皮または、中等度異型上皮の診断であり、同診断部位に病理組織学的に上皮内血管の増生は認めなかった。

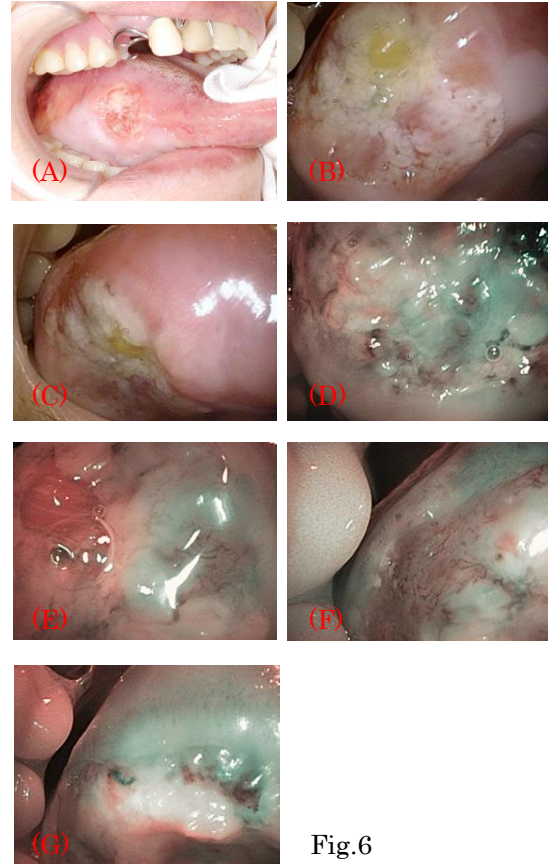


Fig.6

③右側舌下に生じた初期癌

肉眼所見および拡大内視鏡の所見では、表面は平滑で軽度びらんを呈しており、周囲との境界は明瞭であった。外向性の増殖を示していたが、正中に方向に硬結を触れた (Fig.7A, B)。NBI 所見は病変部において、brownish area が明瞭に認められた。さらに同部位に不規則に走行する茶色および緑に描出される血管を確認できた。一部の血管はモザイク状に拡張し蛇行していた。病変部外側には、正常と思われるドット状の緑に描出される血管を認めた。 (Fig7C, D, E, F)。同部位において、切除安全域を設定し、切除術を施行した。病理組織診断は高分化型扁平上皮癌で、切除断端の診断は軽度および中等度異型上皮であったが、病理組織学的に上皮内血管の増生は認めなかった。

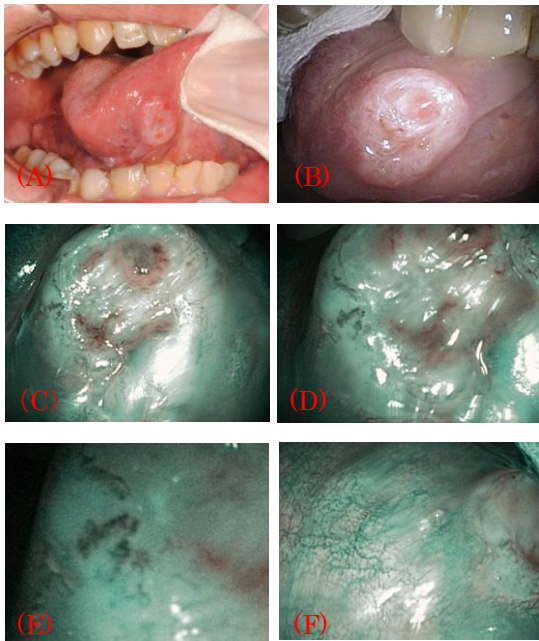


Fig.7

④左側頬粘膜に生じた早期癌

肉眼所見および拡大内視鏡の所見では、表面はカリフラワー状で凹凸不正。周囲との境界はやや不明瞭であった。外向性の増殖を示しており、深部での硬結は認めなかった。

(Fig.8A, B)。NBI 所見は病変部において、brownish area が不明瞭ではあったが認められた。さらに同部位に濃い緑色に描出される拡張した血管が確認できた。病変部外側の正常粘膜には、ドット状の緑に描出される正常血管を認めた。(Fig7C, D, E)。安全域を設定し、切除術を施行した。病理組織診断は高分化型扁平上皮癌で、切除断端の診断は軽度および中等度異型上皮であったが、病理組織学的に上皮内血管の増生は認めなかった。

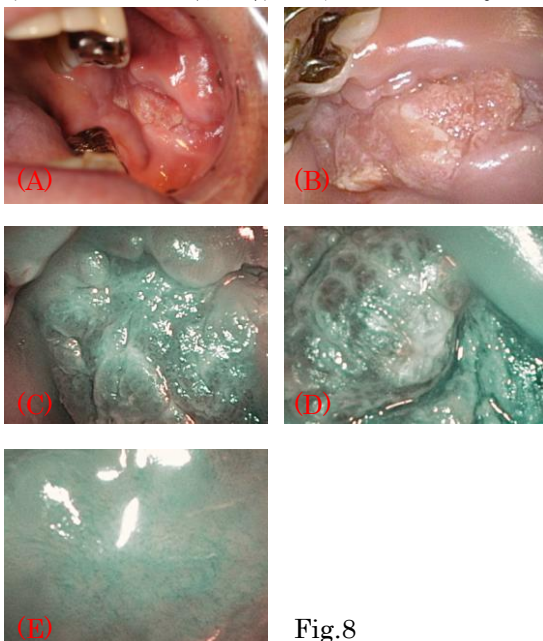


Fig.8

本研究において、上皮内に位置する上皮内血管が上皮内癌で有意に多いことが示され、NBI を応用した口腔癌の切除範囲の検討においても、明らかな浸潤癌部位において、brownish area が認められ、さらにその外側の上皮内癌と考えられる領域においては、主に、茶色や濃緑に描出される拡張した異常血管が認められた。この異常血管は、病理組織学的には、上皮内血管または、初期浸潤癌などにおける、血管新生によるものと考えられた。この領域を切除することで、切除断端に上皮内血管の残存は認められず、NBI を用いた切除断端の決定は有効であることが示された。今後は、NBI による、上皮内癌の診断および、平面的な切除範囲の決定のみならず、切除必要な深さの決定などの発展が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船山昭典 (FUNAYAMA AKINORI)

新潟大学医歯学総合病院・医員

研究者番号：80529686

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：